

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Estudio de la respuesta de linfocitos T condicionados por células epiteliales
de la mucosa oral

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

M^a Magdalena Molero Abraham

Directores

Pedro Reche Gallardo
María Esther Lafuente Duarte

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



**ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE
LINFOCITOS T CONDICIONADOS POR
CÉLULAS EPITELIALES DE LA MUCOSA
ORAL**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

M^a MAGDALENA MOLERO ABRAHAM

Dirigida por

Dr. PEDRO RECHE GALLARDO

Dra. M ESTHER LAFUENTE DUARTE

MADRID, 2017

"Porque pudo y porque quiso "

(Dicho viseño)

Llegado este momento, toca recordar a todas aquellas personas importantes que han aportado su granito de arena para que yo hoy pueda estar escribiendo estas palabras.

En primer lugar agradecer a mis directores el tiempo y la entrega que me han dedicado, no solo para llevar este trabajo sino para todo lo que he necesitado en estos años, habéis sido mis guías y acompañantes en este duro camino. Pedro Reche gracias por contratarme ya hace 4 años dándome la oportunidad de formar parte de tu equipo, de tus proyectos, por abrirme tantas puertas y confiar en mí para desarrollar distintos proyectos. Desde ese momento he aprendido tantas cosas que necesitaría otros dos tomos para enumerarlas. También agradecer el tiempo y la dedicación de Esther Lafuente, siempre has tenido un hueco para mí, para escucharme, para enseñarme, para diseñar experimentos y hasta manualidades. Sobre todo estas últimas semanas, sin tu ayuda no lo hubiese conseguido, no sé cómo agradecerte todo el tiempo y el esfuerzo que me has dedicado siempre con una sonrisa.

Agradecer a José Luis Subiza, tanto su ayuda económica como por su apoyo científico. Nos has dedicado un tiempo muy valioso y he aprendido mucho de ti.

Por otra parte agradecer a todos los profesores del departamento: María José, Paula, Eduardo, Manolo, Narcisa, Edgar, Pedro, José Ramón, Manolo(celular), por vuestros consejos, no solo de ciencia, sino también de la vida, sois unos buenos referentes a los que admirar.

No me gustaría olvidarme de Lola, por los abrazos de cada día, por tu insistencia siempre en sacarme una sonrisa y verme feliz. Pilar, nuestra limpiadora favorita, gracias por tu dedicación, por tus palabras, por hacerme sentir como de tu familia.

Gracias a todos los chicos del laboratorio, a los que están y a los que ya se han ido: Alex, Sara, Álvaro, Raquel, Nacho, Juan..., a mis chicas, Ana, Anaïs, Patricia, Rocío y Bea, sin vosotras no podría haberlo conseguido, me encantan nuestras tertulias del té, nuestros apoyos incondicionales, nuestras ganas de “quemar” el mundo. En especial a ti, Anaïs, quería agradecerte haber sido mi compañera en esta última etapa de escritura, por avanzarme tanto trabajo, por tener mis dudas resueltas antes de tenerlas, por las llamadas de horas, por compartir conmigo los nervios y las alegrías, si tuviese que pasar otra vez por estos momentos te volvería a elegir.

No puedo olvidarme de Carmen y Juan, mis referentes, mi apoyo más grande, desde el principio y sin conocerme me disteis la mano, confiasteis en mí. Gracias a vosotros nunca me he sentido sola, habéis sido mis psicólogos, creedme cuando os digo que sin vosotros no estaría aquí.

Me siento afortunada, por haber coincidido con todos vosotros en esta etapa de mi vida, sois una pieza más de mi puzzle, por ser parte de mí ahora y para siempre.

Agradecer también a mis amigas Belén, Marta y Mari que hayamos fortalecido nuestra amistad en estos años, nuestras quedadas han sido una fuente de fortaleza para mí. Gracias por estar siempre ahí, en lo bueno y en lo malo.

Esto tampoco hubiese sido posible sin el apoyo y la ayuda de Jorge Domínguez, él junto con Ángel de la Rosa me introdujeron en el mundo de la ciencia y han estado siempre pendientes de mi bienestar y de mi evolución.

Gracias a mi familia por estar pendientes de mí en cada momento: papá, abuelos, tíos, primos..., En especial a mis almas gemelas, mamá y Silvia gracias por aguantarme, por estar ahí cada día, por hacerme la vida más cómoda. Ya os lo he dicho otras veces, sin vosotras no podría estar aquí, gracias por existir.

Por último, agradecer todo a mi mitad, Nano, tengo tantas cosas que agradecerte que no sabría por dónde empezar. No hay paso que dé en el que tu no vayas a mi lado y el que no soy capaz de dar, me llevas en brazos.

ÍNDICE

Índice

ABREVIATURAS	15
RESUMEN	21
Introducción	21
Objetivos	22
Resultados y conclusiones	22
SUMMARY	29
Introduction	29
Aims	30
Results and conclusions	30
INTRODUCCIÓN	37
1.-La mucosa oral	37
2. Células epiteliales de la mucosa oral	38
3. Células dendríticas de la mucosa oral	41
4. Linfocitos T en la mucosa oral	42
5. Respuesta de la mucosa oral a antígenos: inmunidad vs tolerancia	44
6. La mucosa oral como vía de inmunización: vacunas sublinguales	45
OBJETIVOS	51
MATERIALES Y MÉTODOS	55
1. Células epiteliales de la mucosa oral	55
2. Estímulo bacteriano: Bactek®	55
3. Aislamiento de poblaciones celulares de sangre periférica	56
4. Cocultivos	57
5. Cultivos con medios condicionados de las células epiteliales	58
6. Determinación de marcadores por citometría de flujo	58
7. Análisis de citoquinas por ELISA	59
8. Ensayo de bloqueo del TGFβ soluble en cocultivos.	60
9. Ensayo de proliferación con CFSE	60

ÍNDICE

10. Ensayos de apoptosis	60
11. Análisis estadístico	60
RESULTADOS	65
1. Estudio de la respuesta de células epiteliales de la mucosa oral	65
2. Estudio de la respuesta de las células dendríticas condicionadas por las células epiteliales de la mucosa oral.	70
3. Estudio de la respuesta de las células T CD4 estimuladas en presencia las células epiteliales de la mucosa oral	84
4. Estudio del efecto del cocultivo con las células epiteliales en los linfocitos T CD4	95
5. Estudio del efecto de los linfocitos T CD4 sobre las células epiteliales	101
DISCUSIÓN	107
1. Las células epiteliales de la mucosa oral responden a estímulos bacterianos	107
2. Las células dendríticas condicionadas por las células epiteliales de la mucosa oral maduran parcialmente siendo incapaces de responder a estímulos	109
3. El cocultivo de células dendrítica y células epiteliales modifica el estado de activación y diferenciación de linfocitos T CD4 naïve	112
4. Inhibición de la respuesta Th1 de los linfocitos CD4 por contacto directo con las células epiteliales	113
5. Estudio de los mecanismos por los que las células epiteliales median la supresión de los linfocitos T CD4	115
CONCLUSIONES	121
BIBLIOGRAFÍA	125
ANEXOS	139
CURRICULUM	139
VITAE PUBLICACIONES	145

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AID	cytidin deaminasa
APC	Célula presentadora de antígenos
BAFF	Factor de activación de células B
CD	Cluster de diferenciación
CEACAM	Antígeno carcinoembrionario relacionado a la molécula de adhesión
CCR7	Receptor de quimioquinas
CE	Célula epitelial
CFSE	5,6-carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester
CL	Células de Langerhans
DC	Célula dendrítica
FBS	Suero fetal bovino
GC	Centro germinal
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
ICOS	ligando coestimulador inducible
iDC	Célula dendrítica inmadura
HSP	Proteína de choque de calor
IL	Interleuquina
IFN γ	Interferón gamma
LFA	Antígeno asociado a función linfocitaria
LN	Nódulo linfático
LPS	Lipopolisacáridos bacterianos
MALT	Tejido linfático asociado a la mucosa
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
NK	células “natural killer”
NL	Nódulo linfático
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PD-1	Proteína “Muerte celular programada 1”
PD-L1	Ligando de PD1
pCD	Célula dendrítica plasmacitoide

ABREVIATURAS

PMA Forbol 12-,iristato 13-acetato

rTEM linfocitos residentes de memoria

STAT activador de la transcripción

TCR Receptor de moléculas T

TGF- β Factor de crecimiento transformante beta

TLR Receptores toll-like

TNF α Factor de necrosis tumoral alfa

Treg Linfocitos T reguladores

TSLP linfopoyetina estromal tímica

RESUMEN

RESUMEN

Introducción

La mucosa oral es una zona primaria de interacción con microorganismos y antígenos, en la que se concentran una gran cantidad de células del sistema inmunitario. Está tapizada por un epitelio escamoso estratificado que constituye una barrera física entre el medio interior y el exterior. Bajo este epitelio escamoso, se encuentran células dendríticas (DCs), localizadas en la lámina propia o intercaladas entre células epiteliales (ECs). La población de DCs es muy heterogénea e incluye células de Langerhans y otros tipos de DCs mieloides residentes. En la mucosa oral también encontramos una gran cantidad de linfocitos, siendo los predominantes los linfocitos T (LT), aunque no se conoce la composición exacta de LT en la mucosa, estudios en la encía muestran que más del 80% de los linfocitos son T CD4, casi un 20% LT CD8 y un 5% son LT intraepiteliales. Y se cree que esta composición es compartida en el resto de la mucosa oral.

En la mucosa oral se articulan importantes mecanismos de defensa y tolerancia en los que destaca el papel de las DCs. Las DCs son células centinelas que capturan antígenos y los presentan a los linfocitos, habilitando sus propiedades efectoras y condicionando su diferenciación. En concreto, los LT CD4 naïve adquieren distintos fenotipos (Th1, Th2, Treg, etc.) gracias a su interacción con las DCs y las señales proporcionadas por éstas (coestimulación, citoquinas y presentación antigénica, etc.). Sin embargo, estas señales proporcionadas por DCs están condicionadas por la interacción de la DCs con el entorno. En particular, las DCs son capaces de recibir instrucciones y condicionarse por señales recibidas de las células epiteliales de la mucosa.

Las células epiteliales de la mucosa son las que primero y más estrechamente interaccionan con los microorganismos y antígenos extracelulares, son capaces de secretar gran cantidad de citoquinas y quimioquinas en respuesta a estímulos. Pueden secretar citoquinas como el TSLP, que influyen en las DCs y determinan cómo éstas condicionan la respuesta inmune adaptativa. Además, otros estudios en células epiteliales como las de la mucosa intestinal y del tracto respiratorio, pueden expresar moléculas de MHC-I, MHC-II y moléculas coestimuladoras como el ligando de muerte programada (PDL1) en células epiteliales del tracto respiratorio, por lo que las ECs pueden influir directamente sobre la respuesta de los linfocitos T. Sin embargo, en conjunto conocemos muy poco sobre el papel activo de las células en la inmunidad y cómo condicionan la respuesta y la tolerancia inmunitaria.

Objetivos

El objetivo principal de esta tesis es estudiar el papel condicionante de las células epiteliales de la mucosa oral en la respuesta inmunitaria.

En concreto nos planteamos 3 objetivos:

1. Estudiar la respuesta de las células epiteliales de la mucosa oral frente a inmunógenos bacterianos
2. Estudiar la respuesta de células dendríticas condicionadas por células epiteliales y su efecto en la diferenciación de LT CD4 naïve.
3. Estudiar la modulación de la respuesta de linfocitos T CD4 por las células epiteliales.

Resultados y conclusiones

En esta tesis hemos utilizado tres tipos de células epiteliales de la mucosa oral, dos líneas epiteliales H413 y TR146, procedentes de carcinomas de células escamosas de la mucosa oral, y células epiteliales primarias de la mucosa oral, aisladas y cultivadas siguiendo un protocolo optimizado durante el curso de esta tesis, consiguiendo mantenerlas viables durante más de ocho días. Como estímulo principal utilizamos una vacuna sublingual utilizada para evitar infecciones del tracto respiratorio, Bactek®, formulada con una mezcla de diferentes especies de bacterias inactivadas pero no lisadas: (*Staphylococcus aureus* (15%), *S. epidermidis* (15%), *Streptococcus pneumoniae* (60%), *Klebsiella pneumoniae* (4%), *Branhamella catarrhalis* (3%) and *Haemophilus influenzae* (3%).

La respuesta de las células epiteliales frente a Bactek® se estudió analizando marcadores de maduración de células presentadoras de antígenos (CD86, CD80, CD40, CD83, MHC-I y MHCII) y la producción de citoquinas. Todos los marcadores analizados se expresaron en niveles muy bajos, excepto CD40, y en presencia de Bactek® no hubo grandes cambios. Sin embargo, el tratamiento de las células epiteliales con IFN γ incrementó significativamente los niveles de HLA-DR y MHC-I, siendo el incremento más marcado en las líneas que en las ECs primarias.

En cuanto a la secreción de citoquinas, medimos por ELISA IL1 β , TGF β , IL6, TNF α , IL8 y TSLP. De forma constitutiva las células H413 y TR146 liberaron IL-6, IL-8 y la secreción incrementó en presencia de Bactek®. En cambio, las ECs orales primarias secretaron, en general, niveles más bajos de citoquinas que las líneas celulares, exceptuando la secreción de TGF β que fue mayor y que, curiosamente, disminuye significativamente tras la exposición de las células a Bactek®.

También analizamos la expresión génica de las células epiteliales H413 y TR146 en respuesta al Bactek®, los resultados obtenidos arrojaron modificaciones en la expresión de componentes de distintas vías, sobre todo aquellas que afectan al metabolismo y el cáncer. También mostraron un aumento en la expresión génica de citoquinas proinflamatorias como IL1, IL6, TNF α y TGF β .

En conjunto estos resultados sugieren que las células epiteliales de la mucosa oral responden activamente a los estímulos y producen citoquinas que pueden modular la respuesta inmunitaria.

La respuesta de las células dendríticas condicionadas por células epiteliales se estudió bien en cocultivos con células epiteliales (DCs+ECs) tratadas o no con Bactek® o bien tratando las DCs en medio condicionado de la ECs, consistente en el sobrenadante de células epiteliales cultivadas previamente con o sin Bactek®. Esta respuesta se comparó con la de DC cultivadas con tan solo los estímulos (LPS y Bactek®). Por una parte se analizaron por citometría de flujo marcadores de maduración (CD86, CD80, CD40, MHC-I y HLA-DR) y por otra se midieron las citoquinas resultantes de los cultivos por ELISA (IL1 β , TNF α , IL12, IL6, IL8, IL10 Y TGF β). Como se esperaba las DCs tratadas con Bactek® incrementaron significativamente todos los marcadores de maduración analizados. Sin embargo, el incremento en la expresión de estos marcadores de maduración fue mucho menor cuando las DCs se condicionaron con las ECs, independientemente de la presencia de Bactek®. Este fallo en la maduración fue más acusado en los cocultivos de DCs con H413 y ECs primarias.

Las DCs estimuladas con Bactek® produjeron altos niveles de TNF α , IL12, IL6, e IL10 y fueron marginales en DCs sin estimular. En cambio, en los cultivos de DCs con ECs o con medio condicionado de ECs se detectaron cantidades significativas IL12, IL6 e IL10 independientemente de la presencia de Bactek®. Además, en el cultivo de DCs y ECs primarias los niveles de IL1 β , TNF α e IL10 fueron mayores que los detectados en la DCs sin condicionar, independientemente de la presencia del estímulo.

En conjunto estos resultados sugieren que el contacto con ECs mantiene a las DCs en un estado de semi-maduración, y altera el perfil de citoquinas secretado impidiendo que respondan al mismo nivel.

La diferenciación de LT CD4 naïve mediada por DCs se realizó en presencia y ausencia de ECs en los cultivos, se analizó la producción de citoquinas (IFN γ , TNF α , IL6, IL4, TGF β e IL10) y la expresión de CD25 (marcador de activación) y FOXP3 (marcador de Treg). Los LT CD4 diferenciados en ausencia de ECs produjeron grandes cantidades de IFN γ mientras que en cultivos que han estado en presencia de éstas fueron indetectables. Además en los cultivos con DCs y ECs primarias, incrementan los niveles de TNF α e IL10. También encontramos que los LT CD4 diferenciados en presencia de las líneas epiteliales H413 y TR146 expresaron bajos niveles de CD25. Singularmente, los LT CD4 diferenciados en presencia de ECs primarias, expresaron altos niveles de CD25 y encontramos un 19% de células FoxP3+.

También estudiamos el condicionamiento de la diferenciación de LT CD4 naïve en ausencia de DCs, activando con anti-CD3 y anti-CD28. La diferenciación de los LT CD4 la realizamos cultivando los LT CD4 con ECs o con medio condicionado de ECs. Como control utilizamos LT CD4 tratados de igual manera pero sin condicionar por la EC. Para evaluar la respuesta de los LT CD4 medimos IFN γ , TNF α , IL2, IL4, TGF β e IL10 en los distintos cultivos. Las LT CD4 sin condicionar produjeron altos niveles de IFN γ y TNF α y estos incrementaron cuando se estimularon con Bactek®. Sin embargo, cuando se cultivaron con ECs no produjeron cantidades significativas de estas citoquinas. Lo inverso ocurrió con TGF β , que incrementó cuando los LT CD4 se activaron en presencia de ECs. Mediante este tipo de aproximación también observamos que las células epiteliales son capaces de suprimir la producción de IFN γ y TNF α de LT CD4 totales y linfocitos Th1, diferenciados previamente in vitro. Este efecto tan solo se observa cuando los linfocitos T CD4 están en contacto con las células epiteliales y es mayor

RESUMEN

cuando se emplea las líneas celulares H413 y TR146. Además, en los cocultivos con LT CD4 totales observamos un aumento de TGF β .

Estos resultados junto a los obtenidos con las células dendríticas apuntan a que hay una supresión en la diferenciación hacia Th1, junto con una inhibición de la respuesta Th1

Para explicar el mecanismo por el que el contacto directo de células epiteliales con LT CD4 suprime la producción de IFN γ y TNF α , realizamos distintos experimentos utilizando la línea H413 y LT CD4 estimulados anti-CD3 y anti-CD28. En primer lugar analizamos el estado de activación de los LT CD4, comprobando que tenían niveles reducidos de CD69 y CD25 en comparación con LT CD4 estimulados en ausencia de ECs. En este contexto parece que las ECs interfieren en la activación de LT CD4. También observamos que la capacidad proliferativa de los LT CD4 estimulados en cocultivo con células epiteliales está disminuida. Sin embargo, las células epiteliales no inducen la muerte celular ni apoptosis en los LT CD4 a juzgar por los marcajes realizados con Anexina V y 7AAD. Además, tampoco observamos un incremento en la expresión de PD1, marcador de muerte programada. Estos experimentos no explican nuestros resultados pero descartan que los LT CD4 estén muertos o entrando en apoptosis.

Para estudiar si los LT CD4 entran en un estado de anergia, analizamos si el efecto que provoca la EC sobre los LT CD4 es reversible. Para ello analizamos si los LT CD4 activados en contacto con ECs recuperan la producción de IFN γ y TNF α cuando se aíslan de las ECs. Nuestros resultados indican que los LT reactivados son capaces de recuperar los niveles de TNF α que secretan los LT CD4 en ausencia de contacto con las ECs. En cambio, la producción de IFN γ no se recupera completamente y esta disminuida en un 75%.

Aunque en los cocultivos de LT CD4 con ECs hay un incremento de TGF β este no parece ser responsable de la inhibición de la producción de IFN γ y TNF α , ya que el bloqueo con anticuerpos anti-TGF β no tuvo ningún efecto. En cambio, comprobamos que las ECs son capaces de secuestrar/retirar IFN γ y TNF α presente en el medio pero a unos niveles que tampoco explican la casi ausencia de ambas citoquinas en los cocultivos. Por último, comprobamos que los LT CD4 activados son capaces de incrementar la expresión de MHC-I y MHC-II de las células epiteliales.

Los resultados obtenidos en el curso de esta tesis destacan la capacidad condicionante de la respuesta inmunitaria de las células epiteliales de la mucosa oral. En concreto nuestros resultados apuntan que las células epiteliales tienen un papel importante en el control o freno de la respuesta de inmunitaria, particularmente de respuesta Th1 inflamatoria, por mecanismos que implican el condicionamiento de la respuesta mediada por célula dendrítica y mediante mecanismos que regulan de forma directa la respuesta de los LT, requiriendo estos últimos el contacto linfocito T y célula epitelial.

SUMMARY

SUMMARY

Introduction

The oral mucosa is a primary zone of interaction with microorganisms and antigens, in which a great amount of immune system cells are located. It is formed by a stratified squamous epithelium which constitutes a physical barrier between the inner and outer environment. Beneath this squamous epithelium, dendritic cells (DCs) are found localized in the lamina propria or interspersed between epithelial cells (ECs). DCs population is very heterogenic, and it includes Langerhans cells and other types of myeloid resident DCs. A great amount of lymphocytes can also be found in the oral mucosa, being T cells the predominant ones, although the exact composition of T cells in mucosa remains unknown; studies in gums show that more than 80% of lymphocytes present are T-CD4, 20% are T-CD8 and 5% are intraepithelial T cells. It is believed that this composition holds true to the rest of the oral mucosa.

In the oral mucosa, important mechanisms of defense and tolerance take place, among which the role of DCs stands out in particular. DCs are sentinel cells that capture antigens and present them to lymphocytes, thus enabling their effector properties and conditioning their differentiation. Specifically, naïve CD4 T cells acquire their different phenotypes (Th1, Th2, Treg, etc.) thanks to their interaction with DCs and the signals produced by them (co-stimulation, cytokines and antigenic presentation, etc.). However, these signals provided by DCs are influenced by the interaction of DCs with the environment. Notably, DCs are able to receive instructions and compromise themselves to the received signals from the mucosal epithelial cells.

Mucosal epithelial cells are the first ones to interact with microorganisms and extracellular antigens in a very intimate way, being able to secrete a great quantity of cytokines and chemokines in response to stimuli, such as TSLP, which have an impact on DCs and determine how these condition the adaptive immune response. Besides, epithelial cells such as the ones found in the intestinal mucosa and the respiratory track can express MHC-I, MHC-II and co-stimulatory molecules, such as the programmed death ligand 1 (PDL1) in epithelial cells from the respiratory tract, thus showing that ECs can directly influence over the T cells response. However, we know very little altogether about the active role of cells in immunity and how they condition the immune response and tolerance.

SUMMARY

Aims

The main aim of this thesis is to study the conditioning role of oral mucosal epithelial cells in the immune response.

We specifically outlined three aims:

To study the response of oral mucosal epithelial cells to bacterial immunogens.

To study the response of dendritic cells conditioned by epithelial cells and their effect in naïve CD4 T cells differentiation.

To study the modulation of CD4 T cells response by epithelial cells.

Results and conclusions

In this thesis we have used three types of epithelial cells from the oral mucosa: two epithelial lines, H413 and TR146, originating from carcinomas of squamous cells from the oral mucosa, and primary epithelial cells from the oral mucosa, which were isolated and cultured following an optimized protocol throughout the thesis, managing to keep them viable for longer than eight days. A sublingual vaccine was used as main stimulus so as to avoid infections in the respiratory tract, Bactek®, formulated with a mixture of different species of inactivated, but not lysed, bacteria: *Staphylococcus aureus* (15%), *S. epidermidis* (15%), *Streptococcus pneumoniae* (60%), *Klebsiella pneumoniae* (4%), *Branhamella catarrhalis* (3%) and *Haemophilus influenzae* (3%).

The response of the epithelial cells to Bactek® was studied by analyzing markers for maturation of antigen presenting cells (CD86, CD80, CD40, CD83, MHC-I and MHCII) and cytokine production. All markers analyzed were expressed in very low levels, except those of CD40, and no big changes took place in the presence of Bactek®. However, the treatment of epithelial cells with IFN γ significantly increased the levels of HLA-DR and MHC-I, and this increment turned out to be higher in the cell lines than in the primary ECs.

In regard to cytokine secretion, IL1 β , TGF β , IL6, TNF α , IL8 and TSLP were measured by ELISA. Cell lines H413 and TR146 constitutively secreted IL-6 and IL-8, and the secretion increased in the presence of Bactek®. However, primary oral ECs generally secreted lower levels of cytokines than the ones found in the cell lines, with the exception of TGF β secretion, which was higher, and which oddly enough, was significantly reduced after exposure to Bactek®.

The genetic expression of H413 and TR146 epithelial cells in response to Bactek® was also analyzed, and the obtained results showed modifications in the expression of components from different pathways, especially those which affected metabolism and cancer. An increase in genetic expression of proinflammatory cytokines, such as IL1, IL6, TNF α and TGF β was also found.

Taken together, these results suggest that oral mucosal epithelial cells actively respond to stimuli

and produce cytokines which may modulate the immune response.

The response of dendritic cells conditioned by epithelial cells was studied both in co-cultures with epithelial cells (DCs + ECs) treated or untreated with Bactek®, as well as by treating DCs in a conditioned medium of ECs based on the supernatant from epithelial cells which had previously been cultivated or uncultivated with Bactek®. This response was compared to the one found in DCs cultured just with stimuli (LPS and Bactek®). On the one hand, maturation markers were analyzed via cytometry (CD86, CD80, CD40, MHC-I and HLA-DR), while on the other hand, the cytokines resulting from ELISA studies were measured (IL1 β , TNF α , IL12, IL6, IL8, IL10 and TGF β). As expected, DCs treated with Bactek® significantly increased all the maturation markers analyzed. However, the increase in the expression of these maturation markers was much lower when the DCs were conditioned with the ECs, regardless of the presence of Bactek®. This failure in maturation was more marked in the co-cultures of DCs with H413 and primary ECs.

Bactek®-stimulated DCs yielded high levels of TNF α , IL12, IL6 and IL10, whereas these levels were marginal in unstimulated DCs. In contrast, in cultures of DCs with ECs or with an EC conditioned medium, significant levels of IL12, IL6 and IL10 were found, regardless of Bactek®'s presence. Besides, in the culture of DCs and primary ECs, the levels of IL1 β , TNF α and IL10 were higher than the ones detected in unconditioned DCs, regardless of the presence of the stimulus.

Altogether, these results suggest that the contact with ECs keep DCs in a semi-maturation state, and alters the secreted cytokine profile, preventing them to respond at the same level.

Naïve CD4 T cells differentiation mediated by DCs was carried out in the presence and absence of ECs in cultures, and the production of cytokines (IFN γ , TNF α , IL6, IL4, TGF β and IL10), CD25 expression (marker for activation) and FOXP3 (marker for Treg) were analyzed. Differentiated CD4 T cells, in the absence of ECs, produced big quantities of IFN γ , whereas in those cultures that had been in the presence of the former, these quantities were undetectable. Furthermore, the levels of TNF α and IL10 increased in cultures with DCs and primary ECs. We also found that the CD4 T cells differentiated in the presence of epithelial lines H413 and TR146 expressed low levels of CD25. Singularly, CD4 T cells differentiated in the presence of primary ECs expressed high levels of CD25 and we also found a 19% of FoxP3+ cells.

We also studied the conditioning of naïve CD4 T cells differentiation in the absence of DCs, activating them with anti-CD3 and anti-CD28. CD4 T cells differentiation was carried out either by cultivation of CD4 T cells with ECs or with conditioned media for ECs. We used likewise treated CD4 T cells as control, but without having been conditioned by the ECs. In order to assess CD4 T cells response, IFN γ , TNF α , IL2, IL4, TGF β and IL10 were measured in the aforementioned cultures. The unconditioned CD4 T cells produced high levels of IFN γ and TNF α , and these levels increased when stimulated with Bactek®. However, no significant amounts of these cytokines were found when these cells were cultivated with ECs. The opposite situation was true for TGF β , since its levels were found to increase when CD4 T cells were activated in the presence of ECs. By following this approach, we also observed that epithelial cells were able to suppress IFN γ and TNF α production in total CD4 T cells and Th1 lymphocytes, which had previously been differentiated *in vitro*. This effect is only observed when the CD4 T lymphocytes are in contact with the epithelial cells, and it is higher when the cell lines utilized are H413

SUMMARY

and TR146. Besides, in co-cultures with total CD4 T cells we observed an increase in TGF β levels.

These results, along with the ones obtained with DCs, indicate that there is suppression in differentiation towards Th1, along with an inhibition of Th1 response.

In order to explain the mechanism by which direct contact between epithelial cells and CD4 T cells suppress IFN γ and TNF α production, several experiments were carried out using the H413 cell line and stimulated anti-CD3 and anti-CD28 CD4 T cells. First of all, we studied the activation state of the CD4 T cells, ascertaining that they had reduced levels of CD69 and CD25 compared to CD4 T cells stimulated in absence of ECs. In this context, it seems like ECs interfere with the activation of CD4 LTs. We also observed that the proliferative ability of stimulated CD4 T cells in co-culture with epithelial cells is diminished. However, epithelial cells induce neither cell death nor apoptosis in CD4 T cells, judging by the markings performed with Annexin V and 7AAD. Furthermore, we also observed no increment in PD1 expression, a marker for programmed cell death. These experiments do not explain by themselves our results, but they rule out the possibility that the CD4 T cells were dead or undergoing apoptosis.

To check if CD4 T cells were undergoing anergy, we analyzed whether the effect that ECs have on CD4 T cells was reversible. In order to do so, we analyzed whether the activated CD4 T cells in contact with ECs recovered their ability to produce IFN γ and TNF α when they were isolated from the ECs. Our results indicate that the reactivated T cells were able to recover the TNF α levels that the CD4 T cells secrete in the absence of EC contact. However, IFN γ production does not recover entirely and remains diminished at a 75%.

Although in co-cultures of CD4 T cells with ECs there is an increase of TGF β , this does not seem to be alone responsible for the inhibition of IFN γ and TNF α production, since blocking with antibodies anti- TGF β did not have any effect whatsoever. However, we realized that ECs were able to sequester any IFN γ and TNF α present in the culture medium but to levels that cannot explain by themselves the practical absence of both cytokines in the co-cultures. Lastly, we found that activated CD4 T cells are able to increase MHC-I and MHC-II expression in epithelial cells.

The results hereby obtained throughout the course of this thesis underline the conditioning ability of the immune response of epithelial cells in the oral mucosa. In particular, our results indicate that epithelial cells have an important role in controlling or stopping the immune response, particularly the inflammatory Th1 response, by mechanisms that both imply the conditioning of the response mediated by dendritic cells and the regulation in a direct way of the response driven by the T cells, which require the contact between T lymphocyte and epithelial cell.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.-La mucosa oral

La mucosa oral forma una barrera de contacto con el medio exterior. Está colonizada por una gran cantidad de microorganismos y está constantemente expuesta a agentes externos. En condiciones normales rara vez se observa inflamación o reacciones alérgicas y a pesar de su importante papel como frontera entre el medio externo y el interno se conoce muy poco sobre los mecanismos que mantienen el equilibrio de la respuesta inmunológica [1-4].

Entre las funciones de la mucosa oral destaca proteger de la colonización e invasión por microorganismos potencialmente peligrosos, prevenir la entrada de antígenos, procedentes de la comida ingerida o de la microbiota y prevenir el desarrollo de fuertes respuestas inmunes a antígenos que consigan atravesar la primera barrera de contacto [5, 6].

A pesar de sus particularidades comparte características con otras mucosas del organismo. Está tapizada por epitelio escamoso estratificado bajo el cual se encuentra la lámina propia, irrigada por una gran cantidad de vasos sanguíneos y linfáticos, donde residen gran cantidad de células del sistema inmune. Además está acompañada de tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT), un entramado difuso compuesto por macrófagos, células dendríticas (DCs), linfocitos T, linfocitos B y células plasmáticas [2, 5]. Las células dendríticas constituyen el componente inmunológico más potente de la mucosa oral, ya que son las encargadas de activar y polarizar a los linfocitos T naïve y por tanto son el principal componente en inducir la inmunidad o determinar la tolerancia [7] (Fig.1).

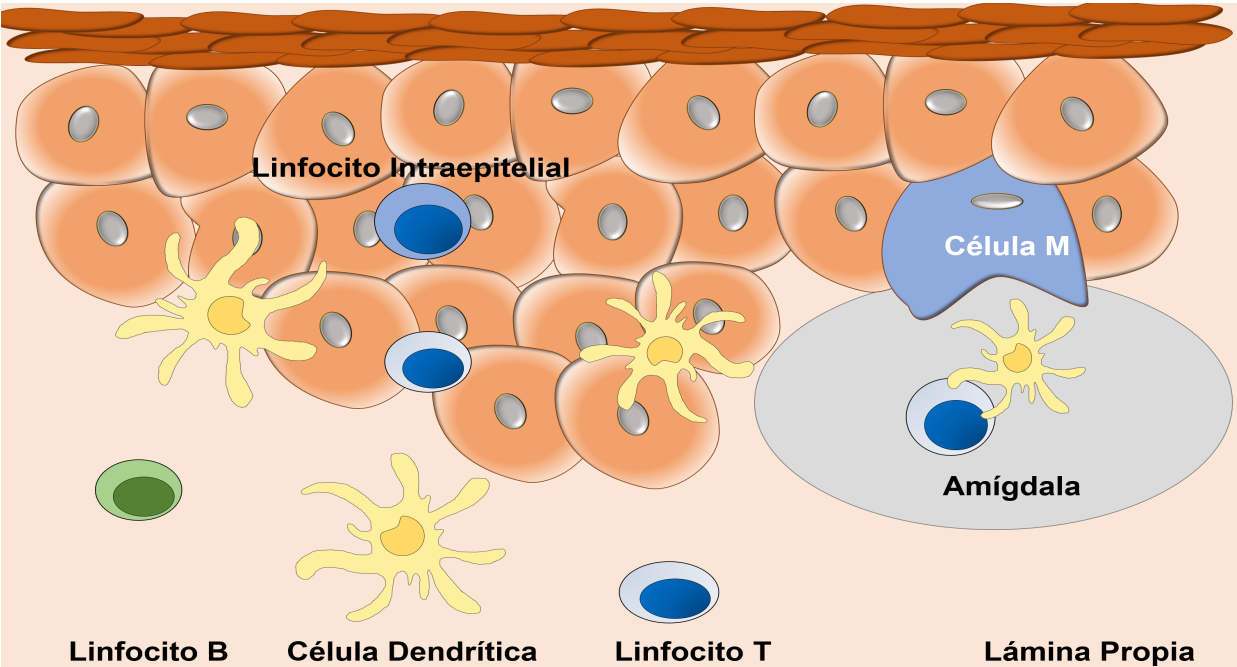


Figura 1. Estructura y composición celular de la mucosa oral. La mucosa oral está formada por epitelio, la lámina propia, células dendríticas residentes en la lámina basal o intercaladas entre las células epiteliales, linfocitos.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha prestado gran atención a los mecanismos inductores de inmunidad y tolerancia asociados a mucosas y son varios los trabajos en los que se ha descrito un papel para las células epiteliales como moduladoras de la respuesta inmunológica [8-12]. Estos estudios básicamente se han centrado en la mucosa intestinal, en la mucosa de las vías aéreas [13-17], siendo la mucosa oral muy poco estudiada. Podríamos extrapolar las conclusiones alcanzadas en estos estudios y aventurar que el epitelio de la mucosa oral también pueda condicionar la respuesta inmune, bien a través de las células dendríticas o directamente a través de los linfocitos T. Por ello en esta tesis nos hemos planteado estudiar cual es el posible papel de las células epiteliales de la mucosa oral en el desarrollo de la respuesta inmune.

Además, está en auge utilizar a la mucosa oral, concretamente la región sublingual, como vía de inmunización [18-21]. Esto se debe a que es una región accesible y a que se ha comprobado que la administración de antígenos por esta vía es capaz de inducir respuesta/tolerancia a nivel sistémico [22].

A continuación, describiremos las características más importantes de aquellas poblaciones celulares de la mucosa oral involucradas en la respuesta inmune, además de las ventajas de la utilización de vacunas sublinguales.

2. Células epiteliales de la mucosa oral

La cavidad oral se encuentra tapizada por epitelio escamoso estratificado. Este epitelio es el encargado de mantener la integridad estructural de la mucosa, regenerándose por procesos de renovación celular continua y migración de capas más profundas hacia la superficie.

A diferencia de otras mucosas, en la mucosa oral el epitelio se compone de varias capas que describimos a continuación desde la parte más interna a la más externa [23] (Fig.2):

-Estrato germinativo o basal. Formado por una única capa de células cúbicas o cilíndricas. Estas células se encuentran en continua división y son las encargadas de la renovación epitelial. Junto a los fibroblastos, son los que generan la lámina basal que separa el tejido epitelial del tejido conjuntivo. En el estrato germinativo se encuentran intercalados linfocitos (intraepiteliales) y células dendríticas.

-Estrato espinoso: está compuesto por varias capas de células con forma poligonal, con un núcleo pequeño y redondeado. En el citoplasma hay gran cantidad de citoqueratina, además de inclusiones de glucógeno. También se pueden encontrar en este estrato células de Langerhans y de Merkel.

-Estrato granuloso: formado por dos o tres capas de células aplanadas o escamosas, con núcleo pequeño. En el citoplasma hay gran cantidad de gránulos de queratohialina, que tiene un papel importante en el proceso de queratinización.

-Estrato córneo: es la capa más superficial, compuesta por células planas sin núcleo evidente, estas células son también conocidas como corneocitos.

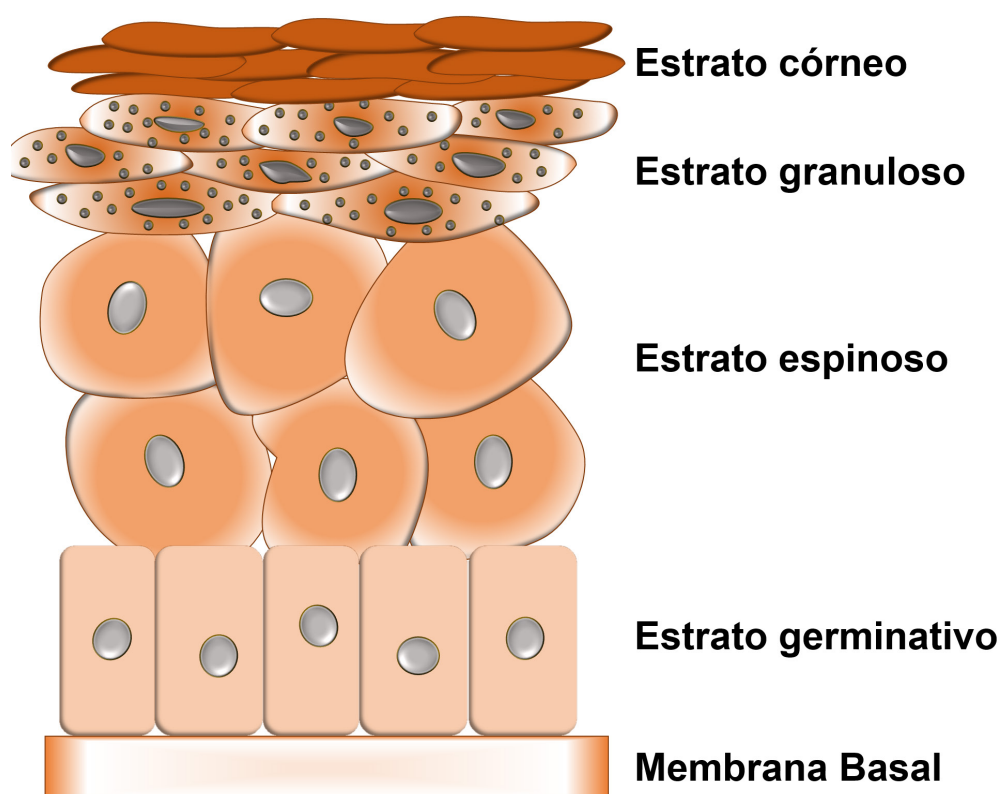


Figura 2. Esquema representativo del epitelio estratificado de la mucosa oral. El epitelio está apoyado sobre la membrana o lámina basal. El estrato germinativo es la capa encargada de formar el resto de estratos.

La función principal de las células epiteliales (ECs) es la de formar una barrera física y estructural entre el medio interno y externo. También protegen contra el daño mecánico producido por la entrada de sustancias u organismos y evitan la pérdida de líquidos. Además, las ECs producen péptidos antimicrobianos, como adrenomedulina o IL37, RNasas, lectinas (galectina 4 y 8) o β -defensinas, pudiendo atacar y destruir directamente a microorganismos [24-26]. En los últimos años se ha indagado sobre el papel de las células epiteliales de la mucosa intestinal, de las vías aérea y ocular entre otras, en el desarrollo de la respuesta inmune [16, 27, 28].

Las ECs poseen receptores de reconocimiento de patrones moleculares, pudiendo reconocer distintos tipos de microorganismos (Tabla 1). El reconocimiento de componentes de la pared bacteriana tiene lugar a través de TLR2 y TLR4 que son expresados por ECs de la mucosa oral [29-31], mucosa intestinal [32-34], epitelio ocular [35], epitelio de las vías aéreas [36] y epitelio genito-urinario [37]. TLR5 es el receptor de flagelina, expresado también en la mucosa oral [38], intestinal [39, 40], epitelio de las vías aéreas [41] y en las ECs vaginales [42]. TLR9 reconoce CpG de bacterias y está expresado por ECs de la encía [43] y del intestino [33, 44]. La unión de estas moléculas a los receptores induce la activación del factor de transcripción NF κ B promotor de la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF e IL8 y de moléculas coestimuladoras[27].

INTRODUCCIÓN

Además también expresan en el citoplasma miembros de la familia de receptores para dominios de oligomerización para la unión a nucleótidos (NLRs) como NOD1 y NOD2 (Tabla 1). Estos receptores reconocen respectivamente ácido D-glutamyl-diaminopimélico y muramil dipéptidos en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y actúan de forma sinérgica con TLRs activando NFκB e IRF (interferon regulatory factor) [45] induciendo la síntesis de citoquinas como IL1β o IL-6 [46-50]. Otros miembros de esta familia de receptores están involucrados en la activación con inflamasomas, que desarrollan respuestas proinflamatorias o la producción de moco en la mucosa intestinal [51, 52].

La expresión en las células epiteliales de moléculas de MHC-II y moléculas coestimuladoras ha inducido a plantear la posibilidad de que estas células puedan actuar como presentadoras de antígeno a linfocitos T. Se ha observado que en ECs de la mucosa oral, en concreto experimentos realizados con la línea HOK-18 expuestas a infección con bacterias vivas, sobreexpresan MHC-II, CD70, CD80 y CD86 [11]. En ECs del colon inflamado expresan CD86 y CD80 [53] y MHC-II en ratón [54]. En ECs de la epidermis se ha descrito la expresión de MHC-I y MHC-II, moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 y de ICAM-I, molécula de adhesión que al interaccionar con integrinas b2 puede inducir una coestimulación adicional o incluso sustituir la proporcionada por la interacción de CD80/CD86 con CD28[55]. En condiciones normales estas ECs de la epidermis expresan bajos niveles de CD80, CD86, ICAM-1 y MHC-II y niveles moderados de MHC-I, bajo condiciones de inflamación (presencia de IFNγ), estas ECs incrementan la expresion de ICAM-1, MHC-I, y MHC-II, por lo que podrían actuar potencialmente como células presentadoras de antígeno [56]. En estudios en las ECs nasales observaron que en pacientes alérgicos estaba sobreexpresados HLA-DR y CD86 [57]. Todo esto nos indica que las ECs pueden tener un papel importante en presentación de antígenos a los linfocitos T, para lo que se requiere un contacto directo célula epitelial-linfocito.

Epitelio	Marcadores APCs	Receptores de reconocimiento de patrones moleculares	Referencias
Oral	MHC-II, CD70, CD80, CD86,	TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, NOD1 NOD2	[29-31] [38] [43] [11]
Intestinal	MHC-II, CD80, CD86	TLR2, TLR4, TLR5, TLR9	[32-34] [39, 40] [43] [63]
Aéreo	MHC-II, CD86,	TLR2, TLR4, TLR5	[36] [41] [57]
Epidermis	MHC-I, MHC-II, CD80, CD86, ICAM-1	TLR2, TLR4	[55]

Tabla 1. Resumen de los marcadores típicos de células presentadoras de antígenos (APC) y receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos presentados por distintos tipos de células epiteliales.

Además de secretar citoquinas como IL1β, TNF e IL8, que crean un ambiente proinflamatorio, las ECs pueden secretar citoquinas inmunomoduladoras como TSLP, que al unirse a su receptor presente en la DC induce en ésta la produccion de IL10 e IL6 desarrollando una respuesta Th2 [15, 17, 58]. También las ECs expresan TGFβ inductor de fenotipos Th17 y Treguladores [59]. Las ECs tambien contribuyen a la inmunidad adaptativa permitiendo la trancitosis de la IgA, mecanismo esencial para mantener el control de las bacterias en el lumen. La IgA es secretada por células plasmáticas en forma de dímeros, que son reconocidos por las ECs del intestino a través del receptor pIgR. Las IgA atraviesan las ECs

y son liberadas en el lumen, donde marca a las bacterias para posteriormente ser fagocitadas [60, 61]. Se ha descrito que las ECs intestinales [62, 63], de la epidermis [64] y del pulmón [65] participan en la captación de antígeno, desarrollan autofagia pudiendo eliminar directamente a microorganismos a través de la degradación por lisosomas. Además tanto ECs intestinales [66] como procedentes del colon [67] son capaces de transportar antígenos unidos a inmunoglobulina A (IgA) desde el lumen hacia la lámina basal

En resumen, las células epiteliales no sólo tienen una función como barrera física, sino que tienen un primer papel activo en la defensa de la invasión de microorganismos, en el transporte de IgA hacia el lumen y en el posible condicionamiento de la respuesta de las DCs a través de sus citoquinas y de la respuesta de los linfocitos a través del contacto directo. Todos estos estudios sugieren que las células epiteliales pueden ejercer un papel importante en las funciones de inmunidad innata y adaptativa.

3. Células dendríticas de la mucosa oral

El sistema inmune de la mucosa oral tiene un elaborado mecanismo para mantener la homeostasis inmunológica, siendo las células dendríticas de la mucosa oral (DCs) las encargadas de inducir la inmunidad o la tolerancia.[2] Las DCs tienen un papel crítico conectando la inmunidad innata y adaptativa. Se sabe muy poco sobre la función de las DCs de la mucosa oral, debido a que la obtención de tejido sano es limitado. La mayoría de los trabajos se han centrado en el estudio de las células de Langerhans (LCs), ya que son las DCs mayoritarias residentes en la mucosa oral [68]. Estas células están caracterizadas por la expresión del marcador específico Langerina [69, 70] aunque todas también expresan CD1a. Estas células residentes están distribuidas en la lámina propia a la espera de captar antígenos externos.[71]. Sorprendentemente, las LCs expresan niveles constituidos elevados de los marcadores de maduración MHC-II y CD83, sugiriendo que están todas en un estado de maduración parecido siendo posible que estas células sean las encargadas de inducir la tolerancia [68].

Adicionalmente, en la mucosa oral se pueden encontrar otros tipos de DCs, como las DCs convencionales de origen mielóide, caracterizadas por la expresión del marcador DC-SIGN (CD209), a las cuales se les atribuye el desarrollo de la inmunidad [69]. En condiciones de inflamación, también pueden encontrarse DCs plasmacitoides de origen linfóide, caracterizadas por la expresión de CD123 y BDCA-2, también encargadas de desarrollar respuestas inmunitarias [72]. Otra población importante en la inducción de tolerancia a bacterias y antígenos externos son las DCs CD103⁺ [73] Estas células se encuentran en la lámina propia y producen ácido retinoico para diferenciar a los linfocitos en T reguladores a través de la inducción del factor de transcripción FoxP3, aunque si hay presencia de TGFβ en el ganglio también puede diferenciar a Th17. En los últimos estudios han comprobado que es posible que estas DCs tolerogénicas puedan adquirir propiedades proinflamatorias en condiciones de inflamación, como han demostrado en estudios de colitis en ratón [74]. Aunque su papel en la mucosa es el de mantener la tolerancia.

Una vez el antígeno es capturado por la DCs, esta adquiere un fenotipo maduro que desarrolla durante su migración al ganglio más cercano, donde podrá presentar antígeno a linfocitos naïve y desarrollar una respuesta inmune adecuada. Mediante estudios en la mucosa oral de ratón se ha comprobado que la habilidad de migrar al ganglio es diferente según el tipo de DC. En concreto las LCs migran y maduran de forma más lenta que las células dendríticas de la submucosa (pueden tardar hasta 4 días en

INTRODUCCIÓN

llegar al nódulo linfático más cercano), probablemente debido al hecho de que expresan bajos niveles de CD40, CD86, PD-L1 y PD-L2 [75, 76]. Estas propiedades contribuyen a que se mantenga un ambiente tolerogénico.

La inducción de la tolerancia en la mucosa oral está aún en estudio, sin embargo distintos estudios realizados en la mucosa intestinal han determinado que las células epiteliales educan a las DCs para que respondan solo frente a los patógenos y no frente a los comensales. Esta distinción es aún desconocida, se especula que por una parte solo los patógenos serían capaz de atravesar la barrera epitelial, por lo que al entrar en contacto con las DCs se produciría la respuesta inflamatoria. Y por otra parte, es posible que las ECs al expresar bajos niveles de TLR 2 y TLR4 reconozcan a los comensales y generen señales citoprotectoras, a través de la producción de PGE-2 o activando la ruta de NEMO [77]. También las ECs educan a las DCs para que no desarrollen una respuesta inflamatoria en presencia de comensales, secretando citoquinas, como TSLP o TGF β que hacen que las DCs respondan induciendo una respuesta Th2 o Treg, respectivamente [13]. Mientras que en una infección, las ECs secretan IL8, CCL20 o CCL9 que reclutan nuevas DCs no educadas en el ambiente de la mucosa intestinal y que inducen la inmunidad a través de un perfil Th1. Por lo tanto, es posible que la tolerancia se deba, en parte al condicionamiento del epitelio que recubre la mucosa oral y a la capacidad de respuesta que tienen las DCs que se encuentran bajo éste [78].

Los trabajos más recientes apuntan a que las ECs son capaces de discernir entre patógenos y comensales por la detección de productos resultado de la actividad metabólica de la microbiota. Productos metabólicos como el ácido láctico de las bacterias acidolácticas interfieren la señalización de TLRs para inhibir una respuesta inflamatoria, bloqueando liberación de IL6, IL8, TNF α , RANTES, y MIP3 α [79]. También los ácidos grasos de cadena corta como acetato, butirato o propionato, resultado del metabolismo anaeróbico de azúcares, inhiben la producción de citoquinas inducidas por TNF α , por un mecanismo que conlleva la modulación de las vías de señalización p38 and JNK, en células epiteliales de riñón [80]

4. Linfocitos T en la mucosa oral

La mucosa oral es un ambiente rico en ECs, macrófagos, DCs y linfocitos T (LT). Los LT que residen en la mucosa, localizados en la lámina propia o intercalados entre el epitelio, tienen un papel muy importante en el desarrollo de la inmunidad y la tolerancia [5].

No hay estudios que nos desvelen el contenido y función de los LT de la mucosa oral. Sin embargo, se ha estudiado la composición de estas células en la encía que se podrían extrapolar a toda la mucosa oral [81], ya que los resultados obtenidos son parecidos a los encontrados en el pulmón, en el intestino e incluso en la piel [82-85]. Existe una predominancia de linfocitos T CD4⁺(>50%), seguida de linfocitos T CD8⁺(>30%) y una menor cantidad de linfocitos intraepiteliales (IELs). Dentro de la población de LT CD4 entre el 10-15% son FoxP3⁺, por lo que estos son potencialmente reguladores, favoreciendo el ambiente de tolerancia de la mucosa. Más de la mitad de los LT encontrados son LT de memoria, por lo que se piensa que estos se quedan retenidos en los tejidos periféricos y no recirculan, utilizándose como objetivo clave para el desarrollo de nuevas vacunas para evitar infecciones en las mucosas [81].

En estudios de la mucosa gastro-intestinal en ratones se ha comprobado que hay un gran número

de LT, encontrando un LT intraepitelial (IEL) cada 5 o 20 ECs [86, 87]. Esto es indicativo de que los linfocitos forman una red que aseguran la integridad y el ambiente de la mucosa. Los LT de la mucosa están clasificados en tres tipos: LT CD4 $\alpha\beta^+$ restringidos por MHC-II, LT $\alpha\beta^+$ restringidos por MHC-I, estas células se desarrollan en el timo y migran a sitios efectores en la mucosa y LT $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ que expresan homodímeros de CD8 $\alpha\alpha$ [86, 88].

Tipo celular	Citoquinas precursoras	Marcador	Citoquinas producidas
Th1	IL12, IFN γ	T-bet	IFN γ
Th2	IL4	GATA-3	IL4, IL5, IL13
Th17	TGF β ,IL6	ROR γ t	IL17, IL22
Treg	TGF β , IL2	CD25, FoxP3	TGF β , IL10
IELTCR $\alpha\beta^+$ CD8 $\alpha\beta^+$	IFN γ , IL2	CD8 α , CD8 β	IFN γ , perforina
IELTCR $\alpha\beta^+$ CD8 $\alpha\alpha^+$	TGFb	CD8 α	TGF β , IL10
IEL $\gamma\delta$		CD8 α	TGF β , IFN γ ,IL10

Tabla 2. Poblaciones de linfocitos T en la mucosa oral

Las mucosas son un ambiente rico en citoquinas producidas tanto por los LT como por las células epiteliales, DCs y macrófagos, que va a determinar la respuesta inmune [59]. Así,tras la activación del TCR, el LT CD4 naïve se diferencia en los distintos tipos de Th dependiendo de las citoquinas del medio (Tabla 2). En un ambiente rico en IL12, se va a producir la diferenciacion hacia Th1 mediante la activación del factor de transcripcion T-bet, estas células secretan grandes cantidades de IFN γ La activación del TCR junto con IL4 van a diferenciar las células a un fenotipo Th2, a través de la transducción de STAT6 y la expresión de GATA-3, que promueve la secreción de IL4 e IL13. La diferenciación hacia Th17 se produce por la presencia de ácido retinoico, TGF β e IL6, secretando estos LT IL17 e IL22. En presencia de TGF β se inducen los Treg, que liberan TGF β e IL10 inhibiendo la respuesta inmune de numerosas células inmunes.[5]

Otro tipo de linfocito importante en la mucosa oral son los linfocitos Th3, estas células están caracterizadas por la secreción de TGF β . Se inducen por la presentación de antígeno a través de DC CD103 $^+$ y por la presencia de IL10 y TGF β en el medio. Sus funciones son inhibir la actividad de linfocitos Th1 y Th2 promoviendo la tolerancia y proporcionar ayuda a la producción de IgA a través de la producción de TGF β [89-91]. Otros linfocitos T reguladores, inducidos por la presencia de IL10, son los linfocitos reguladores tipo 1 o Tr1, que secretan IL10 y TGF β y son FoxP3 $^+$. Sus funciones son inhibir la secreción de citoquinas mediante la secrección de IL10 y suprimir la presentación de antígenos, promoviendo la tolerancia en la mucosa.

Los linfocitos intraepiteliales (IELs) son guardianes de las mucosas. La mayor parte de los linfocitos que encontramos son linfocitos T $\gamma\delta$ y T $\alpha\beta$. Los T $\gamma\delta$ proceden de los timocitos y no están restringidos por moléculas de MHC, aunque pueden responder a antígenos presentados por moléculas de MHC. Pueden activarse con CD1d, moléculas parecidas a MHC (MR1 y CD1c) y otras moléculas relacionadas con vías asociadas a patógenos o a daños. También expresan receptores Toll-like (TLRs) y receptores de NKs, como TLR2, TLR3, TLR4 y NKG2D. todo esto hace que estos linfocitos sean sensibles al estrés

INTRODUCCIÓN

y puedan reconocer a antígenos directamente [5, 81]. Otro grupo importante de IELs son los linfocitos $\text{Ta}\beta$, se han encontrado una gran cantidad de $\text{Ta}\beta$ $\text{CD8}\alpha\alpha$ en las mucosas, su función aún es desconocida, pero se les relaciona con funciones regulatorias inmunes por la producción de $\text{TGF}\beta$ y otras moléculas de carácter inhibitorio, como PD1 o receptores inhibitorios de NK entre otros [5].

En enfermedades de la mucosa oral con deficiencias en el sistema inmune, se han observado que individuos con deficiencia de linfocitos T o defectos en su función, se han asociado con una mayor proporción de infecciones de microorganismos en la mucosa oral [92, 93]. Esto nos proporciona evidencia de la importancia del papel de los LT en la inmunidad y la tolerancia de la mucosa oral.

Debido a que en el epitelio residen una gran cantidad de LT, en los últimos años se ha estudiado si puede haber una comunicación directa entre ambos tipos celulares, ya que las células epiteliales pueden expresar moléculas presentadoras de antígenos, así como moléculas coestimuladoras y CD40. Actualmente no hay ningún estudio sobre el efecto de las células epiteliales de la mucosa oral sobre los LT. Sin embargo en otros trabajos con células epiteliales del colon de ratón, han visto que el contacto directo es capaz de inhibir la activación y proliferación de los linfocitos T CD4 [94]. El epitelio pulmonar también es capaz de inhibir la proliferación de los LT cuando están en contacto directo [95], incluso el epitelio de la retina o del riñón [40, 96]. Estos estudios nos muestran que las células epiteliales son capaces de interactuar directamente con los LT, inhibiendo su activación y proliferación, probablemente como mecanismo para mantener la tolerancia.

5. Respuesta de la mucosa oral a antígenos: inmunidad vs tolerancia

El primer paso para iniciar una respuesta inmunitaria adaptativa es el reconocimiento del antígeno por la DC. Se piensa que la entrada del antígeno a través de la mucosa oral puede darse por dos vías principales: a través de las células epiteliales (células tipo M) o a través de prolongaciones de las células dendríticas que se extienden entre las células epiteliales. El antígeno va a ser reconocido vía distintos receptores de la inmunidad innata (TLRs, DC-SING, NOD), es internalizado y procesado para presentarlo vía MHC. Durante la maduración, la célula dendrítica incrementa la expresión en superficie de moléculas coestimuladoras, como CD80, CD86 y CD40, receptores de quimioquinas y libera citoquinas. Esto va a favorecer que las DCs migren a los nódulos linfoides cercanos para presentar el antígeno a las células T naïve e iniciar la respuesta inmunológica[7].

Para controlar la respuesta frente a alimentos y microorganismos de la microbiota, el sistema inmunológico asociado a la mucosa ha desarrollado diversos mecanismos inductores de tolerancia [4] entre los que destacan la función de linfocitos T reguladores y anergia.

Los principales responsables de inducir el fenotipo de linfocito T regulador en la periferia son las células dendríticas de la mucosa oral, células de Langerhans y DCs CD103^+ , que a su vez están educadas por las células epiteliales para producir tolerancia. Los Treg son los encargados de mediar la tolerancia suprimiendo los linfocitos T efectoras e inhibiendo las respuestas inflamatorias. Treg no responden activamente a la estimulación vía TCR, pero expresan marcadores de superficie como CTLA-4, PD1, GITR, entre otros y secretan $\text{TGF}\beta$, IL10. Además están caracterizadas por la expresión del factor de transcripción FoxP3 y alta expresión de CD25 en su membrana [97, 98]. Algunos tipos de Treg, como

Tr1 y Th3, FoxP3⁺, ayudan a las Treg a mantener la tolerancia y homeostasis inmune secretando altas cantidades de IL10 y TGFβ [90, 97].

TGFβ es una citoquina con efectos pleiotrópicos. Dependiendo del contexto se le atribuyen propiedades proinflamatorias o antiinflamatorias. TGFβ actúa como un potente quimioatrayente de neutrófilos, interviene en la diferenciación de linfocitos proinflamatorios como Th17 y Th9 e inhibe la diferenciación de Th22. Por el contrario es elemento clave en la diferenciación de linfocitos Treg anti-inflamatorios [99]. En el contexto de la mucosa oral se le atribuye un papel inhibitor de la función de los linfocitos T efectores induciendo bloqueo de la proliferación y diferenciación Th1, mediante inhibición de la expresión de T-bet inductor del perfil Th1 [100].

IL-10 es una citoquina conocida por el amplio espectro de efectos inmunosupresores y anti-inflamatorios relacionados con la tolerancia. IL-10 es producida principalmente por macrófagos, células dendríticas y linfocitos T. Entre sus funciones destaca la inducción de la actividad de linfocitos T reguladores productores de IL10 (Linfocitos Tr1), inhibición de la actividad de LT directamente suprimiendo la señalización de CD28 e ICOS [101] e inhibición de la proliferación y producción de IL2, IFNγ, IL4, IL5 y TNFα de linfocitos T CD4 [102]. En células dendríticas, IL10 inhibe la expresión de MHC-II y de las moléculas coestimuladoras (CD80/CD86) limitando la producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias (IL1β, IL6, IL12, IL18 y TNFα, MCP1, MCP5, RANTES, IL8, IP10 y MIP2) [103]. Además promueve el cambio de isotipo a IgG4 e inhibe el de IgE [98].

La expresión de rutas coestimuladoras del receptor de PD1 y su ligando desencadena señales inhibitorias que regulan el balance de la activación del linfocito T y tolerancia. La unión de PD1 con su ligando contribuye directamente a la extenuación del linfocito T y la falta de respuesta por parte de este. PD-L1 y PD-L2 son expresados en DCs tolerogénicas y la unión de los linfocitos T a través de estos ligandos con estas células inicia una respuesta de tolerancia [104].

Otro mecanismo de tolerancia es la anergia, definiendo anergia como un estado duradero de inactividad total o parcial [105]. El estado de anergia puede ser producido bien por una posible presentación antigénica alterada, bien por un reconocimiento del MHC-II sin coestimulación [106], por el reconocimiento de moléculas co-inhibitorias como PD-1 o CTLA-4 [14, 107, 108] o por reconocimiento de un MHC alterado o no cargado [109]. El mecanismo de anergia en los LT efectores contribuye a mantener la tolerancia en la mucosa oral.

En ausencia de inflamación, predomina un ambiente de tolerancia, donde las DCs de la mucosa presentan antígenos de los microorganismos comensales a las T naïve e inducen la diferenciación a Treg y la producción de IL10 y TGFβ [2, 5]. Además estas DCs presentan bajos niveles de MHC y moléculas coestimuladoras en su superficie siendo incapaces de inducir respuestas inflamatorias. Otro mecanismo para mantener la tolerancia en la mucosa oral es la liberación de IgA promovida por un ambiente rico en TGFβ, que se encarga de atrapar y neutralizar antígenos extraños, evitando la colonización de microorganismos. [4].

INTRODUCCIÓN

6. La mucosa oral como vía de inmunización: vacunas sublinguales

La mucosa oral está expuesta a una gran cantidad de antígenos derivados de alimentos y microorganismos, bien comensales o patogénicos, a pesar de ello no se desarrollan normalmente respuestas inflamatorias. Esto es debido a las propiedades tolerogénicas de la mucosa oral necesarias para mantener la homeostasis inmunológica. Debido a estas características ha sido objeto de estudio y es utilizada como vía para inducir tolerancia contra alérgenos [18, 110, 111].

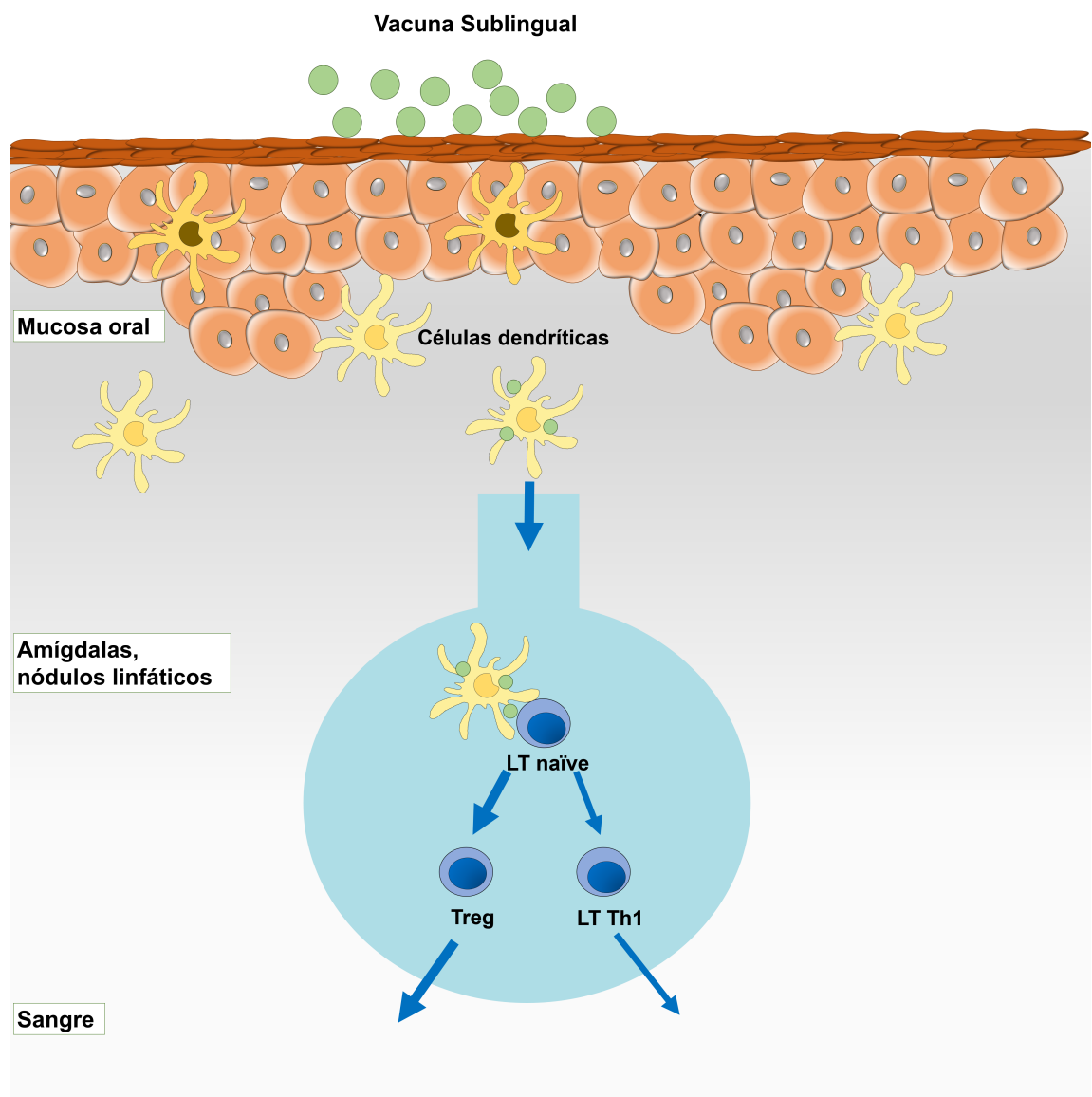


Figura 3. Ruta de procesamiento del alérgeno por administración sublingual. Tras la inmunización el alérgeno se une a las ECs, es capturado por las DCs y procesado. La DC viaja al LN más cercano para diferenciar los LT CD4 naíve en Th1 o Treg. Estos salen a la sangre y vuelven a la mucosa para disminuir la respuesta Th2 preexistente.

En la mucosa sublingual se ha visto que se inicia una amplia respuesta específica que es protectora y sistémica[110]. Estos estudios proporcionan pruebas convincentes de que la activación de las DCs orales generan respuesta sistémica a través de la activación de los linfocitos B y T localizadas en los nódulos linfáticos cercanos (LNs). Estos linfocitos efectores entran en circulación dirigiéndose a diversas mucosas gracias a la expresión de integrinas y receptores de quimioquinas que favorecen su asentamiento en estas zonas. En el caso de la inmunización oral se induce protección antígeno-específica en el estómago, intestino delgado, en el colon ascendente, zona naso-faríngea y además glándulas mamarias y salivares [18, 19, 110].

Tratamiento (molécula diana)	Vacuna
Infecciones gastrointestinales	<i>Helicobacter pylori</i> , <i>Vibrio cholera</i> , <i>Rotavirus</i>
Infecciones respiratorias	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> . Virus Influenza. Virus sincitial respiratorio, Bactek®
Infecciones urinarias	Uromone®, Clamidia, Virus herpes simplex
Alergia	Olivo, gramíneas, ácaros, pelo de animales
Enfermedades autoinmunes	Autoantígenos

Tabla 3. Resumen de algunas de las vacunas sublinguales.

El antígeno de la vacuna sublingual es captado principalmente por las células de Langerhans (célula dendrítica mayoritaria en la mucosa oral). Estas DCs son tolerogénicas, producen IL10 e IL12 que conducen a una diferenciación de los LT CD4 naïve a fenotipos Th1 o Treg (Fig.3). Debido a que hay muy pocas células proinflamatorias (macrófagos o eosinófilos) en la mucosa oral, la probabilidad de que se desarrolle una reacción de inflamación es menor, siendo la ruta sublingual la vía de vacunación más segura.

Se están desarrollando vacunas frente a infecciones víricas y microbianas, frente a enfermedades autoinmunes y frente a alergia (Tabla 3). Se están utilizando vacunas con microorganismos vivos atenuados o con subunidades para prevenir las infecciones gastrointestinales causadas por *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae* entre otros. Para prevenir infecciones en el tracto respiratorio causadas por *Mycoplasma pneumoniae*, influenza virus, virus sincitial respiratorio y de bacterias oportunistas. En este último caso se han diseñado vacunas optimizadas de varias bacterias que suelen ocasionar infecciones recurrentes en el tracto respiratorio, como lo es la vacuna Bactek®, diseñada y comercializada por Immunotek.[110, 112]. También hay vacunas frente a infecciones uro-genitales bien por bacterias, hongos o virus, en esta ocasión, también se ha desarrollado una vacuna con un preparado bacteriano para protegerse de la infección de varias bacterias, Uromone® [112, 113].

La inmunoterapia alérgeno específica tiene como finalidad cambiar la existente respuesta Th2 a una respuesta Th1 no alérgica. Entre las ventajas que presenta este formato de vacunación es que son más fáciles de tomar y más seguras que las vacunas inyectables, por lo que están siendo muy utilizadas [114-116]

INTRODUCCIÓN

También se están desarrollando vacunas sublinguales frente a enfermedades autoinmunes, por lo que se inmuniza a los enfermos con autoantígenos. La eficacia de estas vacunas dependen de la dosis y la frecuencia, bajas dosis promueven la activación de células T CD4 y CD8 reguladoras produciendo TGF β , grandes dosis inducen anergia en células T CD4 efectoras que pueden entrar en apoptosis[89, 110].

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es estudiar el papel condicionante de las células epiteliales de la mucosa oral en la respuesta inmunitaria.

En concreto nos planteamos 3 objetivos:

1. Estudiar la respuesta de las células epiteliales de la mucosa oral frente a inmunógenos bacterianos
2. Estudiar la respuesta de células dendríticas condicionadas por células epiteliales y su efecto en la diferenciación de LT CD4 naïve.
3. Estudiar la modulación de la respuesta de linfocitos T CD4 por las células epiteliales.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Células epiteliales de la mucosa oral

1.1. Obtención y cultivo de células epiteliales primarias de la mucosa oral

Las células epiteliales primarias de la mucosa oral fueron obtenidas de raspados de la cavidad oral de donantes sanos, modificando el protocolo de Agnes Michalczyck et al. Para ello los voluntarios se desinfectaron con enjuague de Listerine® durante 30 segundos, a continuación, con ayuda de un cepillo de dientes, se rasparon la cara interna de la mejilla y realizaron la recogida de las células descamadas a través de enjuagues con agua destilada. Las muestras de los diferentes donantes se agruparon y tras varias centrifugaciones se obtuvieron las células epiteliales. Para evitar contaminaciones de los microorganismo comensales presentes en la cavidad oral de los doantes, se incubaron durante 50 minutos con 500ug/ml de Penicilina (Lonza), 500 ug/ml de Estreptomicina (Lonza), 500 ug/ml de Normocina (Invivogen), 20ug/ml de Ciprofloxacino (Sigma-Aldrich) y 12ug/ml de Fungizone (Gibco), este cóctel de antibióticos y antimicóticos fue optimizado para evitar el crecimiento de bacterias y hongos y mantener la viabilidad celular de las células epiteliales obtenidas. Éstas fueron pasadas a través de un filtro de 100µm, para quedarnos solo con las células individuales, evitando así los fragmentos de tejido, y fueron cultivadas en distintos medios: RPMI, DMEM, DMEM suplementado al 10% con FBS y CNT-24, eligiendo finalmente como el medio óptimo: CNT-24 (CellnTec).

1.2. Cultivo de líneas epiteliales de la mucosa oral

En este trabajo se han utilizado dos líneas celulares procedentes de la mucosa oral humana, las líneas H413 y TR146 (Sigma). La línea H413 procede de un carcinoma de células escamosas de la mucosa oral y se caracterizan por estar moderadamente diferenciadas, se mantienen en cultivo en DMEM: HAMS F12 (Gibco) suplementado con 2mM glutamina (Lonza), 10% suero fetal bovino (FBS) (Gibco), 1% Penicilina/Estreptomicina (Lonza), y 0.5 µg/ml succinato de hidrocortisona de sodio (Sigma). La línea TR146 procede también de carcinoma de células escamosas, caracterizándose por ser células bien diferenciadas queratinizadas, se mantienen en cultivo en medio DMEM (Gibco) suplementado con 2mM glutamina, 10% FBS , 1% Penicilina/Estreptomicina. Se cultivan a 37°C en una atmosfera al 5% CO₂.

2. Estímulo bacteriano: Bactek®

Para la estimulación de las células utilizadas en esta tesis, se utilizó Bactek®, porque su vía de entrada es a través de la mucosa oral y porque su mecanismo de acción es aún desconocido.

Bactek® es una vacuna sublingual utilizada para evitar infecciones recurrentes del tracto respiratorio, desarrollada por Immunotek Su formulación es novedosa e incluye un preparado bacteriano de cepas seleccionadas de bacterias inactivadas pero no lisadas ni fragmentadas, de tal manera que mantienen su integridad estructural. La preparación genérica de este fármaco está compuesta por distintos por-

MATERIALES Y MÉTODOS

centajes de seis cepas de bacterias que suelen ser causa de infección de las vías respiratorias: *Staphylococcus aureus* (15%), *S. epidermidis* (15%), *Streptococcus pneumoniae* (60%), *Klebsiella pneumoniae* (4%), *Branhamella catarrhalis* (3%) y *Haemophilus influenzae* (3%).

Bactek® fue usado en un ensayo piloto donde los voluntarios que tomaron la vacuna durante 6 meses disminuyeron la tasa de infecciones respiratorias. Actualmente en un ensayo clínico fase II-III de doble ciego aleatorizado, se está estudiando el mecanismo inmunológico por el que el fármaco es capaz de inducir una mejora en la clínica.

Puesto que no se sabe aún el mecanismo por el que Bactek® induce respuesta, lo hemos elegido en nuestros estudios como estímulo, ya que la vía de entrada es a través de la mucosa oral. En cada uno de los experimentos hemos partido de la "madre bacteriana", con la que está formulada el fármaco, añadiendo 10 bacterias por cada célula en estudio.

3. Aislamiento de poblaciones celulares de sangre periférica

3.1. Obtención de PBMCs

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se aislaron de sangre periférica de donantes sanos o a partir de concentrados leucocitarios conocidos como buffy coats procedentes del Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid. Para su aislamiento se realizó una centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll-Paque (GE Healthcare) a 800g durante 40 minutos. A continuación se recoge la fracción de células mononucleares y se lavan con PBS para eliminar restos de Ficoll.

3.2. Aislamiento de monocitos y diferenciación a células dendríticas

A partir de las PBMCs se realizó el aislamiento por selección positiva de monocitos mediante métodos inmunomagnéticos usando un kit de anticuerpos anti-CD14 unidos a bolas magnéticas (Miltenyi Biotec) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células CD14+ purificadas se diferenciaron a células dendríticas durante seis días cultivándolas en medio RPMI 1640 suplementado al 10% con suero bovino fetal (FBS) y al 1% con penicilina y estreptomicina (Lonza), suplementando el medio con 400U/ml rhIL4 y 800U/ml rh GM-CSF (Immunotools), refrescando el medio cada 2 días.

3.3. Aislamiento de linfocitos T CD4 naïve

A partir de las PBMCs se realizó el aislamiento negativo por métodos inmunomagnéticos de linfocitos CD4 naïve CD4+CD45RA+ usando el kit Naïve CD4+ T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.4. Aislamiento de linfocitos T CD4 totales

Para el aislamiento negativo de linfocitos T CD4 totales a partir de PBMCs se usó también métodos

inmunomagnéticos usando el kit CD4⁺ T Cell Isolation (Miltenyi Biotec) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez obtenidas, fueron activadas con antiCD3 y anti CD28 (Dynabeads, ThermoFisher) y cultivadas según las condiciones del experimento.

3.5.Diferenciación de linfocitos T CD4 naïve a Th1

Una vez aislados los linfocitos CD4 naïve se cultivaron en RPMI 1640 suplementado al 10% con suero bovino fetal (FBS) y al 1% con Penicilina y Estreptomicina (Lonza), activados con antiCD3/antiCD28 (Dynabeads, ThermoFisher) y suplementados con 10ng/ml IL12 (Immunotools) y anti-IL4 (Sigma). Tras seis días de diferenciación, los linfocitos fueron recogidos y tras un periodo de descanso de 6 horas fueron reactivados con antiCD3 y antiCD28 y cultivados según las condiciones del experimento.

4. Cocultivos

4.1. Cocultivos directos (contacto célula epitelial-célula dendrítica)

Las células epiteliales (ECs): H413, TR146 y las epiteliales primarias en confluencia fueron cultivadas con células dendríticas (DCs) derivadas de monocitos (relación EC-DC 1:2) durante 48 horas a 37°C para después realizar análisis de fenotipo por citometría de flujo (CD80, CD86, CD40, CD83, HLA-DR, MHC-I) (ver punto 7) y medir el perfil de citoquinas por ELISA (IL6, IL1 β , IL12, IL8, TNF α , IL10, TGF β) (ver punto 8).

4.2. Cultivos de células epiteliales con linfocitos T CD4

Del mismo modo, las células epiteliales en confluencia fueron cultivadas con linfocitos T CD4 (LT CD4) activados con bolas de antiCD3 y antiCD28 (Dynabeads, ThermoFisher) (LT CD4 naïve Totales o Th1) (relación EC-CD4 1:10) durante 48 horas o 6 días en el caso de los LT CD4 naïve. Los sobrenadantes recogidos fueron analizados por ELISA (IFN γ , TNF α , IL2, IL6, IL4, TGF β e IL10) (ver punto 8) , y en la células se analizó la viabilidad celular mediante el análisis de apoptosis (ver a y analizar el fenotipo por citometría (Anexina V, / AAD) (ver punto 10).

4.3. Cultivos de células epiteliales y células dendríticas con linfocitos T CD4 naïve

Las células epiteliales y las células dendríticas (relación EC-DC 1:2) fueron cultivadas durante 48 horas a 37°C con o sin Bactek®. A continuación se añadieron los linfocitos T CD4 naïve recién aislados (relación EC- LT CD4 1:10) y se cultivaron durante 6 días suplementando cada 3 días con IL2 (Immunotools). A continuación se recogieron los sobrenadantes para medir por ELISA (ver punto 8) el perfil de citoquinas secretado (IFN γ , TNF α , IL6, IL4, TGF β e IL10), se analizaron por citometría de flujo para comprobar si adquirirían un fenotipo regulador (FoxP3⁺, CD25) (ver punto 6).

MATERIALES Y MÉTODOS

5. Cultivos con medios condicionados de las células epiteliales

5.1. Obtención de sobrenadantes condicionados por las células epiteliales.

Las células epiteliales se cultivaron durante 48 horas a 37°C con o sin Bactek®, pasado este tiempo se recogieron los sobrenadantes y se filtraron con filtros con un tamaño de poro de 0,22 µm, para asegurarnos de que las bacterias no estuviesen en el sobrenadante. Este medio condicionado sirve como medio de cultivo de las DCs o de los LT CD4 activados con anti CD3 y anti CD28 para estudiar el condicionamiento que tienen las células epiteliales sin estar presentes sobre las DCs o sobre los LT CD4.

5.2. Cultivos de células dendríticas o linfocitos T CD4 con medio condicionado de las células epiteliales

El medio condicionado por las células epiteliales se le añadió como medio de cultivo a las células dendríticas o bien a los linfocitos T CD4 (LT CD4 Totales, naïve o Th1) activados con antiCD3 y antiCD28 y se realizó el cultivo durante 48 horas. A continuación, se recogió el sobrenadante para medir citoquinas por ELISA (ver punto 7).

6. Determinación de marcadores por citometría de flujo

Los anticuerpos usados para el estudio fenotípico de las células epiteliales, células dendríticas y linfocitos T CD4 están recogidos en la tabla 4. Para las tinciones de marcadores de superficie, se lavaron las células con PBS y se bloquearon con gammaglobulina 1/500 en PBS al menos 30 minutos, después se tiñeron con el anticuerpo o la mezcla de ellos a la concentración optimizada durante 30 minutos a 4°C.

Anticuerpo (molécula diana)	Clon	Fluorocromo	Casa Comercial
CD40	HB14	PE	Macs Miltenyi
CD80	L307.4	FITC	BD Pharmingen
CD83	HB15e	FITC	BD Pharmingen
CD83	HB15	APC	Macs Miltenyi
CD86	2331 (FUN-1)	FITC	BD Pharmingen
HLA-DR	AC122	APC	Macs Miltenyi
HLA-ABC	REA230	FITC	Macs Miltenyi
CD25	BC96	APC	eBioscience
FOXP3	236A/E7	PE	eBioscience
7AAD			Biolegend
Anexina V		FITC	Biolegend

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para el análisis de la expresión por citometría de flujo

Para las tinciones intranucleares, las células son fijadas y permeabilizadas con la solución de fijación y premeabilización (eBioscience), lavadas con la solución de permeabilización (eBioscience) y teñidas con el anticuerpo intranuclear.

Las células teñidas fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) y los datos obtenidos analizados con el software FlowJo (TreeStar).

7. Análisis de citoquinas por ELISA

Los sobrenadantes resultantes de los distintos cultivos fueron almacenados a -80°C hasta su utilización. En cada condición se midieron diferentes citoquinas (Tabla 5). En los cultivos con células dendríticas se detectaron: IL6, IL1β, IL12, IL8, TNFα, IL10, TGFβ), en los cultivos con presencia de linfocitos T CD4 se midieron: IFNγ, TNFα, IL2, IL6, IL4, TGFβ e IL10. Para la cuantificación de estas citoquinas se utilizó un ELISA tipo sándwich, con el anticuerpo anti citoquina adherido a la placa, se añadió la cantidad de sobrenadante o de estándar adecuada por duplicado. Se añadió el anticuerpo anti-citoquina con biotina el tiempo establecido por la casa comercial, tras los lavados recomendados, se incubó con Estreptavidina unida a HRP (peroxidasa de rábano picante) para posteriormente revelar con el sustrato TMB, tras la aparición de color se paró la reacción con ácido sulfúrico 1N y se midió la densidad óptica en un lector de placas (Biotek ELx800)

Citoquina/Quimioquina (molécula diana)	Casa Comercial
IFNγ	Invitrogen
TNFα	Invitrogen
TGFβ	Invitrogen
IL1b	Invitrogen
IL2	Invitrogen
IL4	Invitrogen
IL6	Invitrogen
IL8	Immunotools
IL10	Invitrogen
IL12	Immunotools

Tabla 5. Kit de ELISA utilizados para la cuantificación de citoquinas y quimioquinas en los sobrenadantes

El análisis de la cantidad de citoquina presente en los sobrenadantes se realizó mediante una recta de regresión enfrentando los valores de densidad óptica de la recta patrón (standard) con las concentraciones conocidas de ésta. A partir de esta recta se interpolaron los valores de densidad óptica de las muestras en cada caso para conocer la cantidad en pg/ml.

MATERIALES Y MÉTODOS

8. Ensayo de bloqueo del TGF β soluble en cocultivos.

El TGF β soluble en el sobrenadante de las células epiteliales se bloqueó con distintas concentraciones del anticuerpo anti- TGF β (Invivogen) a 20 ng/ml, 300 ng/ml y 2.5 μ g/ml durante 4 horas, a continuación se realizó el cocultivo junto con los linfocitos CD4 durante 48 horas para después recoger el sobrenadante y medir las citoquinas IFN γ y TNF α por ELISA.

9. Ensayo de proliferación con CFSE

Para estudiar la proliferación de linfocitos T CD4 se marcaron con Carboxifluoresceína diacetato succinimidil ester (CFSE), de esta manera evaluamos en el citómetro la división celular, ya que al dividirse las células hijas reciben la mitad del fluorescente de membrana. Los linfocitos T CD4 totales activados con antiCD3 y CD28 son marcados con CFSE durante 15 minutos en oscuridad, se lavó el exceso con PBS y se pusieron en cultivo solos o con las células epiteliales (ratio 1:10) durante 7 días y se analizó la fluorescencia mediante citometría de flujo (BD FACSCalibur).

10. Ensayos de apoptosis

Los linfocitos T CD4 en cultivo junto con las células epiteliales o solos, tras 48 horas de cultivo se recogieron y se tiñeron con Anexina V conjugada a FITC y 7AAD (Biolegend), siguiendo las indicaciones de la casa comercial, a través del análisis por citometría de flujo (BD FACSCalibur) se estudiaron las células en apoptosis (AnexinaV⁺/7AAD⁻), células muertas (AnexinaV⁺/7AAD⁺), células necróticas (AnexinaV⁺/7AAD⁺) y células vivas (AnexinaV⁻/7AAD⁻).

11. Análisis estadístico

Los resultados fueron representados como las media junto con el error medio de la desviación estándar (SEM). Los análisis estadísticos de los resultados obtenidos se llevaron a cabo desarrollando el test *t* student para datos independientes y se representaron las diferencias estadísticamente significativas como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Estudio de la respuesta de células epiteliales de la mucosa oral

El estudio de la respuesta de células epiteliales de la mucosa oral se realizó en varios tipos de células epiteliales procedentes de la mucosa. Utilizamos las líneas celulares H413 y TR146 disponibles comercialmente, procedentes de carcinomas de células escamosas de la mucosa oral. Estas dos líneas presentan una diferenciación con distinto grado de queratinización, siendo las células TR146 las más queratinizadas. Han sido empleadas en distintos estudios de enfermedad periodontal y caries [117-120]. También se han utilizado para el estudio de infecciones víricas en células epiteliales, como el VIH [121], así como para la utilización de modelos de permeabilidad y toxicidad de la mucosa oral [122, 123]. Adicionalmente, se estudió la respuesta de células epiteliales primarias aisladas de la mucosa oral de voluntarios sanos.

1.1. Aislamiento y cultivo de células epiteliales primarias de la mucosa oral

Para el aislamiento de las células epiteliales primarias de la mucosa oral se realizaron raspados en la cara interna de la mejilla de voluntarios sanos de ambos sexos y una edad media de 24 años. El protocolo de aislamiento utilizado permite aislar principalmente células del estrato granuloso de la mucosa oral.

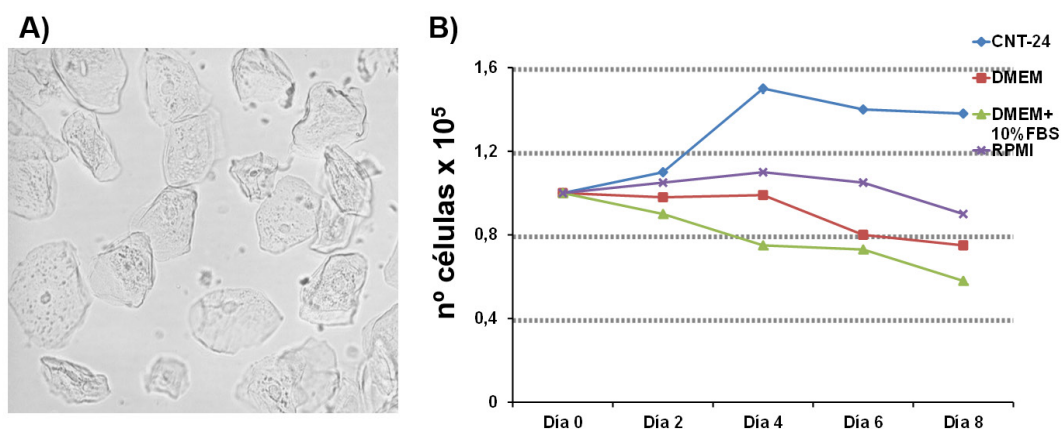


Figura 4 *Aislamiento y cultivo de células epiteliales de la mucosa oral.* A) Células epiteliales primarias obtenidas de raspados de la mucosa oral de voluntarios sanos, son células escamosas del estrato granuloso de la mucosa oral. B) Estudio de la viabilidad en cultivo durante ocho días de las células epiteliales primarias utilizando distintos medios de cultivo: CNT-24, DMEM, DMEM con FBS y RPMI.

Las células aisladas presentan morfología aplanada o escamosa, con un pequeño núcleo bien definido y presentan una gran cantidad de gránulos en su citoplasma (Fig.4A).

Para optimizar el mantenimiento de estas células en cultivo celular, se hicieron ensayos de viabilidad utilizando diferentes medios de cultivo: RPMI, DMEM y DMEM suplementado con suero bovino fetal (FBS) inactivado. También se cultivaron en CNT-24 (CELLnTEC), un medio de cultivo con una formulación específica para el mantenimiento del epitelio oral en cultivo (Fig.4B). Las células se culti-

RESULTADOS

varon en cada uno de estos medios, partiendo en todos los casos de 10^5 células y cada dos días durante ocho días, se tiñeron con trypan blue para discriminar las células muertas. Como muestra la gráfica de la figura 4B, el medio CNT-24 es el más indicado para el cultivo de estas células, alcanzándose un pico máximo de células a los 4 días. En los medios DMEM y RPMI sin suero las células muestran un perfil de viabilidad parecido, aunque sobreviven más células en RPMI. En el caso de la utilización de DMEM suplementado con FBS, se observa que hay un descenso de las células vivas en cultivo a lo largo del tiempo analizado. Esto puede ser debido a que el FBS contiene altas concentraciones de calcio y esto parece retrasar el crecimiento. Además se ha descrito que suero contiene factores de crecimiento y hormonas, entre otros, que pueden alterar la supervivencia de las células epiteliales primarias de la mucosa oral [124, 125]

Por lo tanto, decidimos usar el medio CNT-24 para el cultivo de las células epiteliales recién aisladas y dejarlas en cultivo durante 4 días. Una vez establecidas estas condiciones de cultivo de las células primarias procedimos a determinar, su función como moduladoras de la respuesta inmunológica.

1.2. Caracterización fenotípica de las células epiteliales.

Se ha descrito en la literatura que las células epiteliales pueden expresar marcadores de superficie característicos de células presentadoras de antígenos [53, 56, 57, 126], aunque se desconoce su implicación en la modulación de la respuesta inmunológica. No se ha estudiado en profundidad el papel de estos marcadores en la mucosa oral, por lo que en primer lugar quisimos determinar si las células elegidas expresaban algunos de los marcadores descritos: CD86, CD80, CD40, CD83, MHC-I y MHC-II (HLA-DR). Y en segundo lugar, comprobar si su expresión es modulable y cambia tras la activación de las células con distintos estímulos inmunogénicos. Para ello tratamos las distintas células epiteliales orales con Bactek®, producto farmacológico usado como vacuna sublingual bacteriana para evitar infecciones del tracto respiratorio. Este producto está formulado con una mezcla de diferentes especies de bacterias inactivadas pero no lisadas: (*Staphylococcus aureus* (15%), *S. epidermidis* (15%), *Streptococcus pneumoniae* (60%), *Klebsiella pneumoniae* (4%), *Branhamella catarrhalis* (3%) and *Haemophilus influenzae* (3%). Independientemente tratamos a las células con IFN γ , citoquina proinflamatoria que ejerce un papel activador en la expresión estos marcadores de APCs y que nos sirve como control positivo de la función celular.

Para realizar este estudio, las células epiteliales H413, TR146 y las células primarias del epitelio oral fueron tratadas durante 48 horas con o sin Bactek®. Además, como control positivo de estimulación las células también de cultivaron en presencia de IFN γ [56] Pasada la incubación, fueron recogidas, marcadas y analizadas por citometría.

Como se puede observar en la figura 5A, la línea H413 expresa de forma constitutiva niveles muy bajos de los marcadores analizados, excepto CD40 cuya expresión es moderada. Tras el tratamiento con Bactek® se observa un incremento leve pero significativo de la expresión de CD86, CD80, CD40, HLA-DR y CD83. Este incremento es mayor cuando las células se tratan con IFN γ , siendo más significativo el incremento de CD86, CD40, HLA-DR y MHC-I.

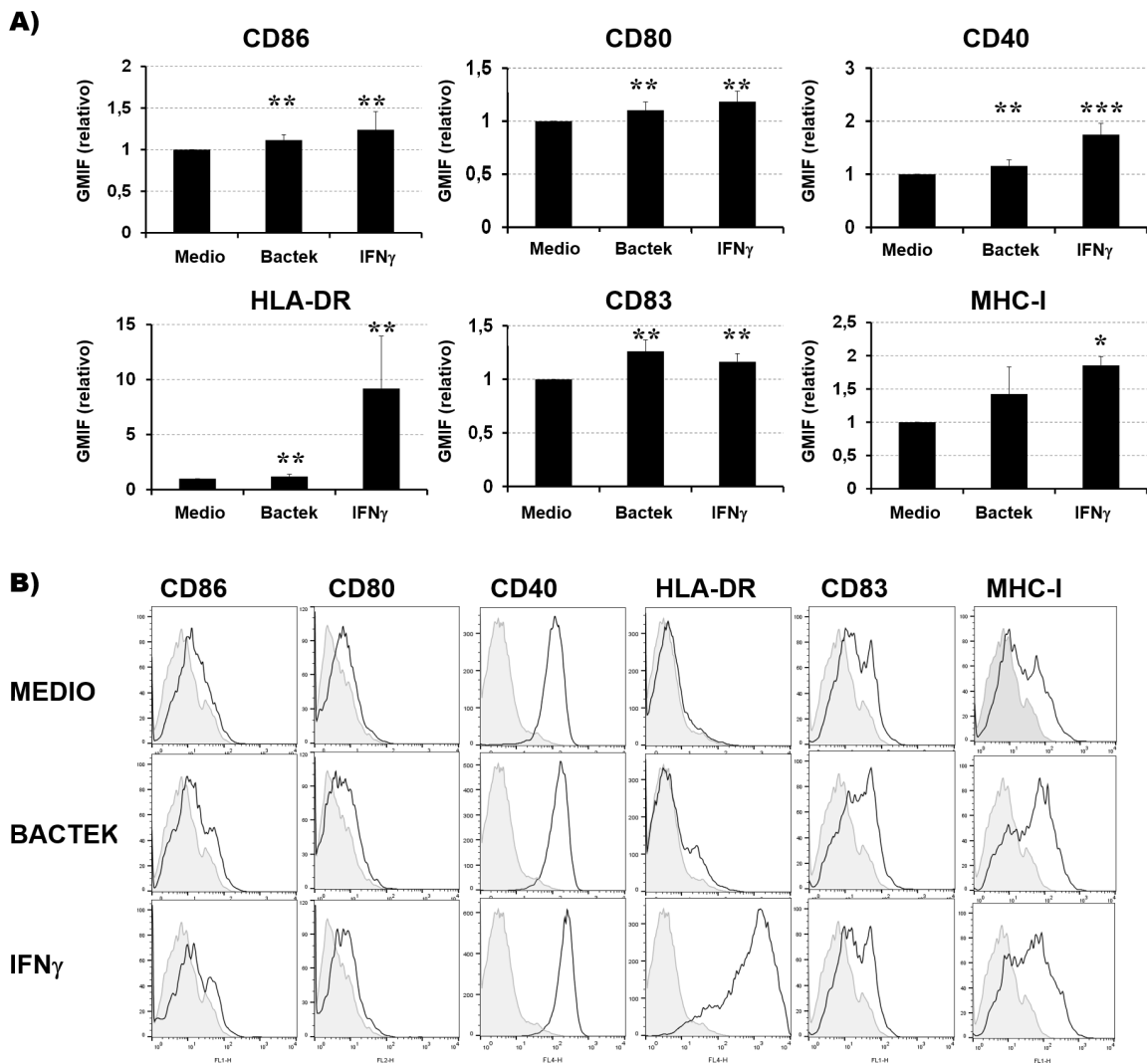


Figura 5. Expresión de marcadores de APCs en las células H413. A) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (GMFI) relativa a la condición del medio de cada marcador. (*, $p<0.005$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$). B) Histogramas de citometría de flujo mostrando la expresión en superficie de CD86, CD80, CD40, HLA-DR, CD83 y MHC-I, en su estado basal (Medio), estimuladas con Bactek® y con IFN γ . Mostrando en gris el control de isotipo y con la línea negra el marcaje en estudio.

La línea TR146 (Fig. 6), se comporta de forma similar a la línea H413. En condiciones basales presenta una expresión baja de los marcadores analizados, excepto CD40 cuya expresión es moderada. Tras el tratamiento con Bactek® se observa un leve incremento significativo de la expresión de CD86 y CD40 y de MHC-I. El tratamiento con IFN γ incrementa la expresión de CD86, CD40 y MHC-I, pero sobre todo de HLA-DR.

RESULTADOS

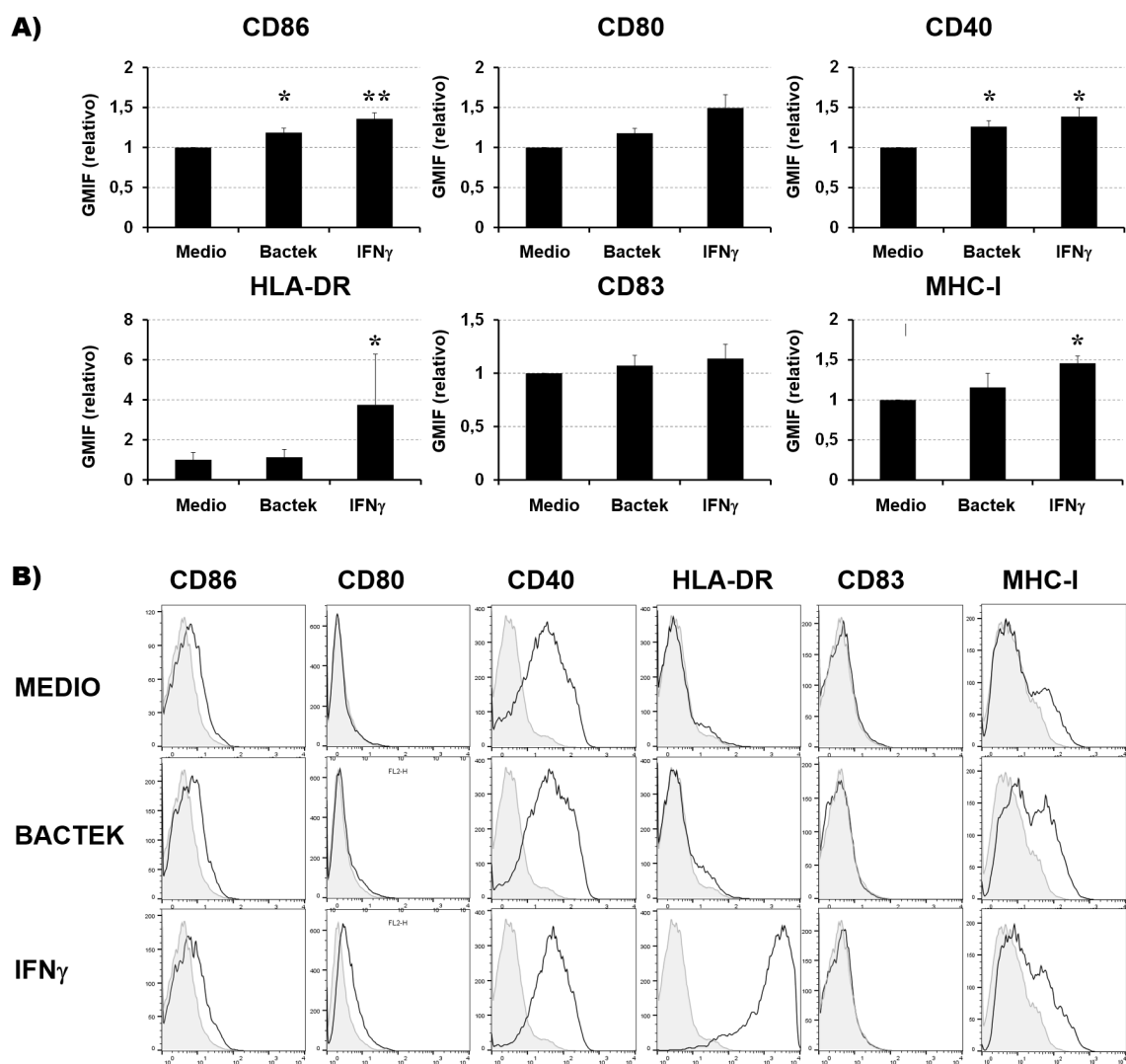


Figura 6. Expresión de marcadores de APCs en las células TR146. A) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (GMFI) relativa a la condición del medio de cada marcador. (*, $p<0.005$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$). B) Histogramas de citometría de flujo mostrando la expresión en superficie de CD86, CD80, CD40, HLA-DR, CD83 y MHC-I, en su estado basal (Medio), estimuladas con Bactek y con IFN γ . Mostrando en gris el control de isotipo y con la línea negra el marcaje en estudio.

En cuanto a las células epiteliales primarias la expresión basal de los marcadores estudiados en las células epiteliales primarias de la mucosa oral (Fig. 7), es prácticamente imperceptible. Tras el tratamiento con Bactek® se observa un leve incremento significativo de la expresión de CD86, CD80, CD40 y HLA-DR. Con el tratamiento con IFN γ incrementan mínimamente los mismos marcadores que con el tratamiento con Bactek®: CD86, CD40, HLA-DR y MHC-I.

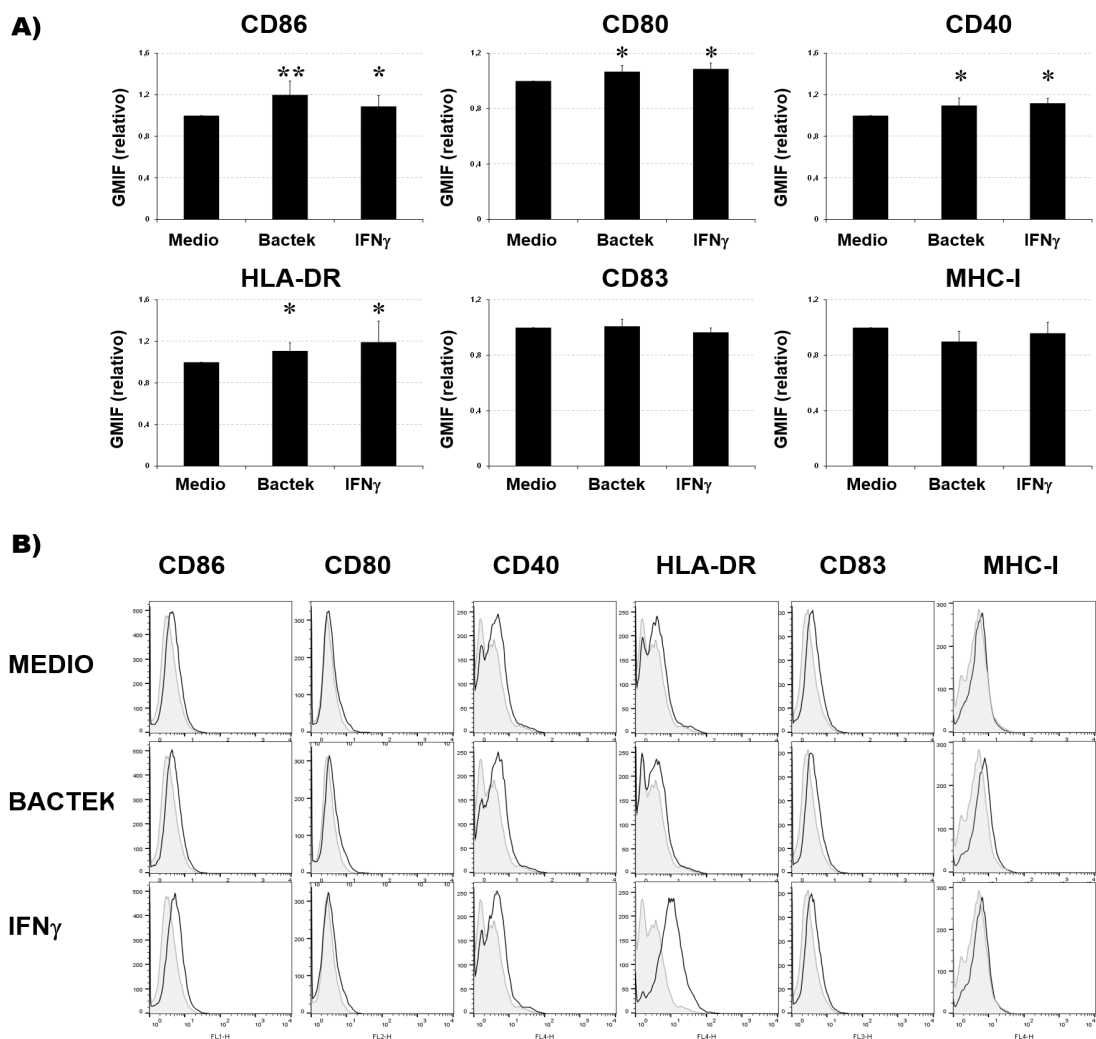


Figura 7. Expresión de marcadores de APCs en las células epiteliales primarias. A) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (GMFI) relativa a la condición del medio de cada marcador. (*, $p<0.005$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$). B) Histogramas de citometría de flujo mostrando la expresión en superficie de CD86, CD80, CD40, HLA-DR, CD83 y MHC-I, en su estado basal (Medio), estimuladas con Bactek y con IFN γ . Mostrando en gris el control de isotipo y con la línea negra el marcaje en estudio

1.3. Producción de citoquinas por células epiteliales

Está descrito en la literatura que las células epiteliales secretan citoquinas al medio de manera basal, para mantener la homeostasis y además son capaces de responder a estímulos, como antígenos infecciosos, comida o comensales. [127], [31]. Por lo que quisimos estudiar la liberación de las citoquinas típicas de células epiteliales: IL1 β , IL6, TNF α , IL8 y TSLP. Para ello, las líneas de células epiteliales primarias, H413, TR146 fueron estimuladas durante 48 horas con o sin Bactek®, pasado el tiempo de incubación, se recogieron los sobrenadantes de las células y se midieron por ELISA distintas citoquinas y quimioquinas.

Nuestros análisis revelaron que de forma constitutiva las células H413 y TR146 producen cantidades significativas de IL6 e IL8 (Fig.8). Tras el tratamiento con Bactek® las células responden incrementando de forma significativa la liberación de IL6 e IL8. Sorprendentemente la capacidad de liberar

RESULTADOS

IL1 β , TNF α y TSLP es muy baja en estas células y no es modulada por la estimulación con Bactek®, tampoco se encontró expresión de IL10 (datos no mostrados).

Las células epiteliales orales primarias secretan en general niveles más bajos de citoquinas que las líneas celulares (Fig.8), exceptuando la secreción TGF β que es moderadamente alta pero que disminuye significativamente cuando se cultiva con Bactek®. Sorprendentemente, el Bactek® no tiene efecto alguno en la producción del resto de citoquinas analizadas en esta células.

2. Estudio de la respuesta de las células dendríticas condicionadas por las células epiteliales de la mucosa oral.

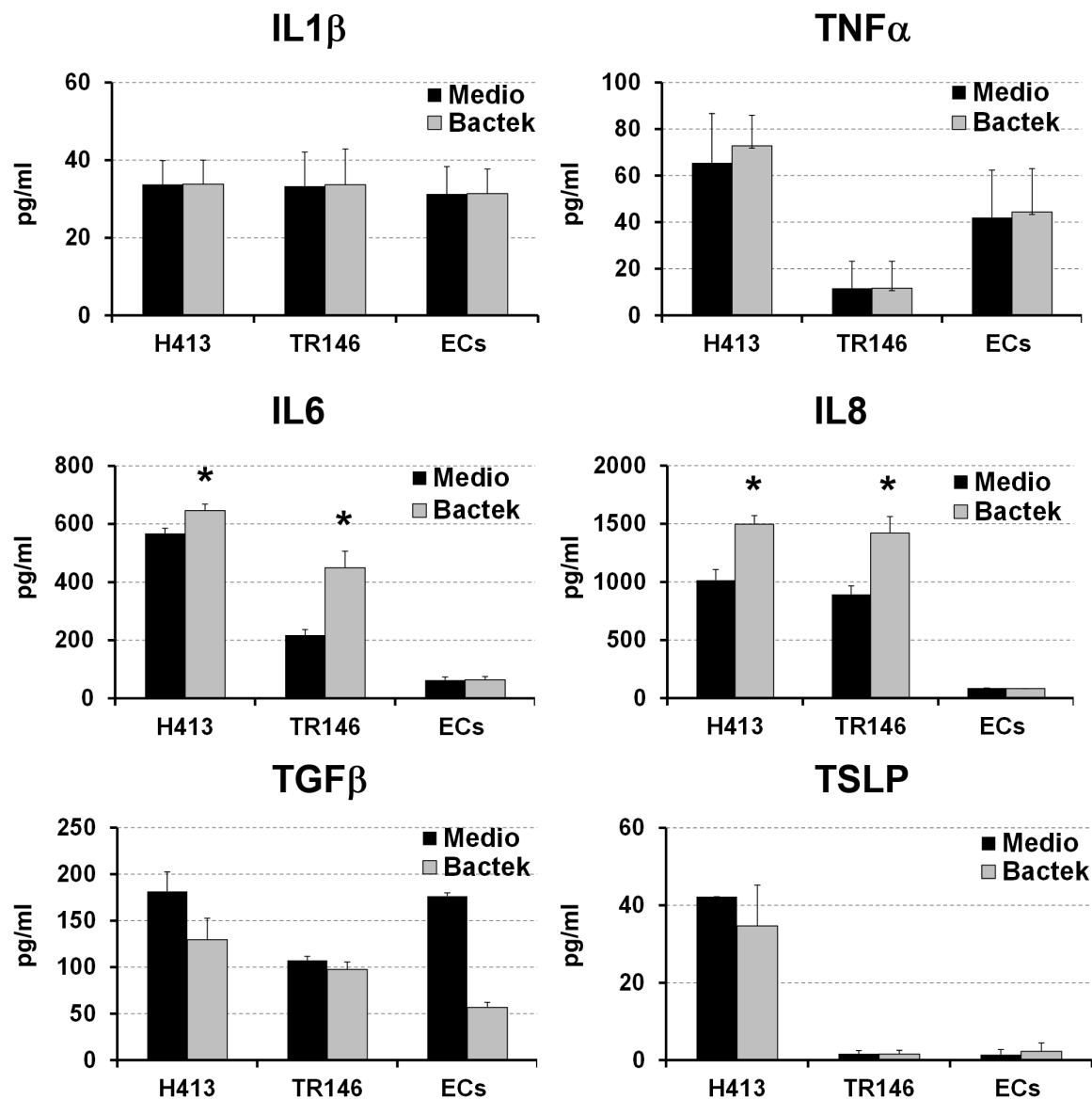


Figura 8. Producción de citoquinas por las células epiteliales de la mucosa oral. La figura muestra los niveles de citoquinas detectados por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de células epiteliales recogidos tras 48 horas de cultivo con o sin Bactek®.

En la mucosa oral hay un gran número de células dendríticas, distribuidas tanto en la lámina propia como intercaladas entre el epitelio que actúan como células centinelas y son determinantes en la inducción de la respuesta inmune adaptativa. Se ha descrito que la respuesta de las DCs puede estar condicionada por las células epiteliales [78, 128]. Por ello, aquí hemos estudiado de qué modo las células epiteliales orales pueden condicionar la respuesta de DCs derivadas de monocitos.

Para estudiar este posible condicionamiento seguimos dos aproximaciones experimentales (Fig 9). En una se co-cultivaron DCs con las células epiteliales de la mucosa oral con o sin Bactek®, estando presente el estímulo durante el tiempo de cocultivo. Mientras que en la otra se cultivaron DCs medio condicionado de células epiteliales. Este medio condicionado contiene los sobrenadantes de cultivos de células epiteliales tratadas con o sin Bactek® durante 48 horas. En paralelo y como controles positivos se utilizaron cultivos de células dendríticas tratadas con Bactek® o LPS.

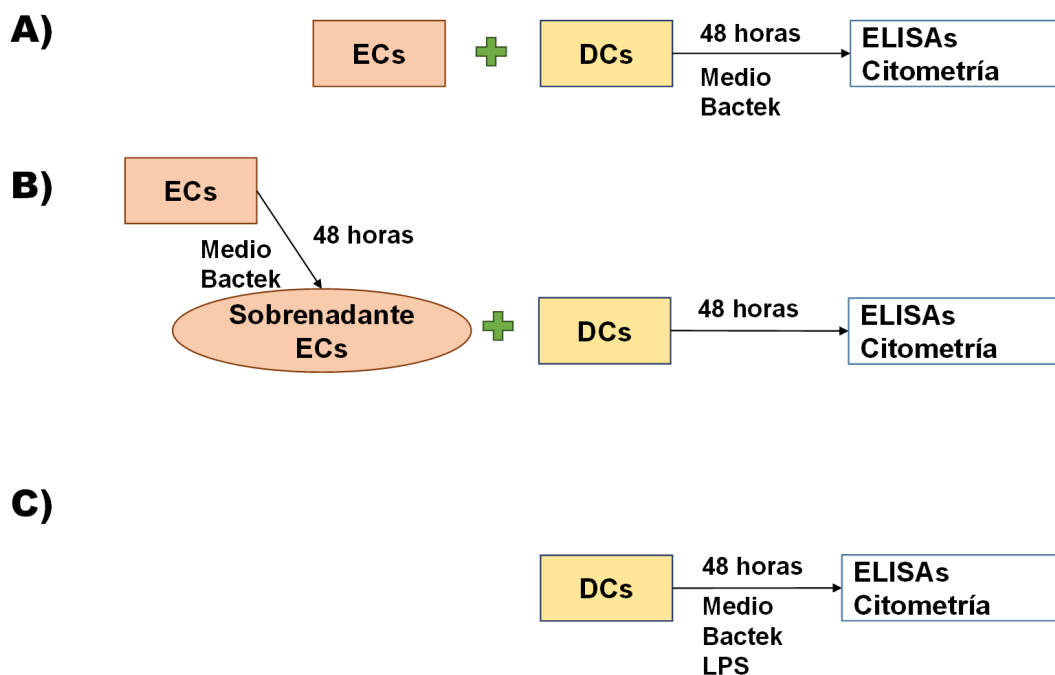


Figura 9. Esquema representativo de la metodología utilizada. A) cocultivos de ECs y DCs durante 48 horas con o sin Bactek®. B) Cultivos de DCs con medio condicionante de ECs previamente tratados o no con Bactek®. C) Cultivos de DCs con medio, Bactek® o LPS. En todas las condiciones se determinó por ELISA la liberación de citoquinas al medio y se analizó la expresión de marcadores en las DCs por citometría.

RESULTADOS

2.1. Fenotipo y respuesta de células dendríticas condicionadas células epiteliales de la mucosa oral

Para estudiar el fenotipo y la respuesta de las células dendríticas condicionadas por células epiteliales de la mucosa oral, se siguió el diseño experimental esquematizado en la figura 9. Por una parte realizamos el cocultivo de moDCs y las células de la mucosa oral de nuestro estudio: H413, TR146 y células epiteliales primarias, estimuladas 48 horas con o sin Bactek®. En paralelo, estimulamos las células epiteliales (H413, TR146 y ECs primarias) con o sin Bactek® durante 48 horas, para recoger el sobrenadante condicionado y añadirsele a las moDCs como medio de cultivo durante 48 horas. Por último se estimularon o no moDCs con Bactek® o LPS durante 48 horas. Tras estos tratamientos se recogieron sobrenadantes de cultivo para medir por ELISA las citoquinas: IL6, IL1 β , IL12, IL8, TNF α , IL10, TGF β y se analizaron los marcadores de superficie de maduración de las DCs: CD86, CD80, CD40, MHC-I y MHC-II (HLA-DR) por citometría.

2.1.1. Expresión de marcadores de maduración en las DCs condicionadas por las células epiteliales

Los marcadores de maduración: CD86, CD80, CD40, MHC-I y MHC-II se analizaron en cada uno de los cultivos de DC descritos en la figura 9 para cada una de las células epiteliales por citometría de flujo.

El análisis de los resultados muestra que las DCs en ausencia de condicionamiento epitelial (DCs controles) producen bajos niveles de todos los marcadores estudiados que incrementan cuando se cultivan con Bactek® o LPS. El tratamiento con LPS induce en las DCs un patrón similar de expresión de marcadores al producido por Bactek® (Fig. 10), lo que indica que el fármaco está induciendo su maduración.

Cuando se realiza el mismo tipo de análisis en las DCs en contacto directo con las H413 (Fig. 10) observamos que en ausencia de Bactek® las células expresan niveles significativos de los marcadores CD86, CD40 y HLA-DR y no aumentan en presencia de Bactek®. Este mismo resultado se observa en las DC cultivadas con el medio condicionado por células epiteliales. Además la expresión de CD80 está incrementada en las DCs cultivadas con los medios condicionados por las H413. En conjunto estos resultados indican que las células epiteliales por sí mismas, y sin necesidad de contacto directo, provocan una maduración parcial de las DCs y adicionalmente también impiden que se complete la maduración en presencia de estímulos como Bactek® o LPS.

En las DCs condicionadas con TR146 (Fig. 11) observamos niveles significativos de CD86, CD40, HLA-DR y MHC-I que aumentan con Bactek®. Este efecto solo se observa cuando las DCs se cultivan directamente con las TR146, cuando se cultivan con medios condicionados de TR146 tratados con Bactek® no hay incremento en la expresión de ninguno de los marcadores analizados.

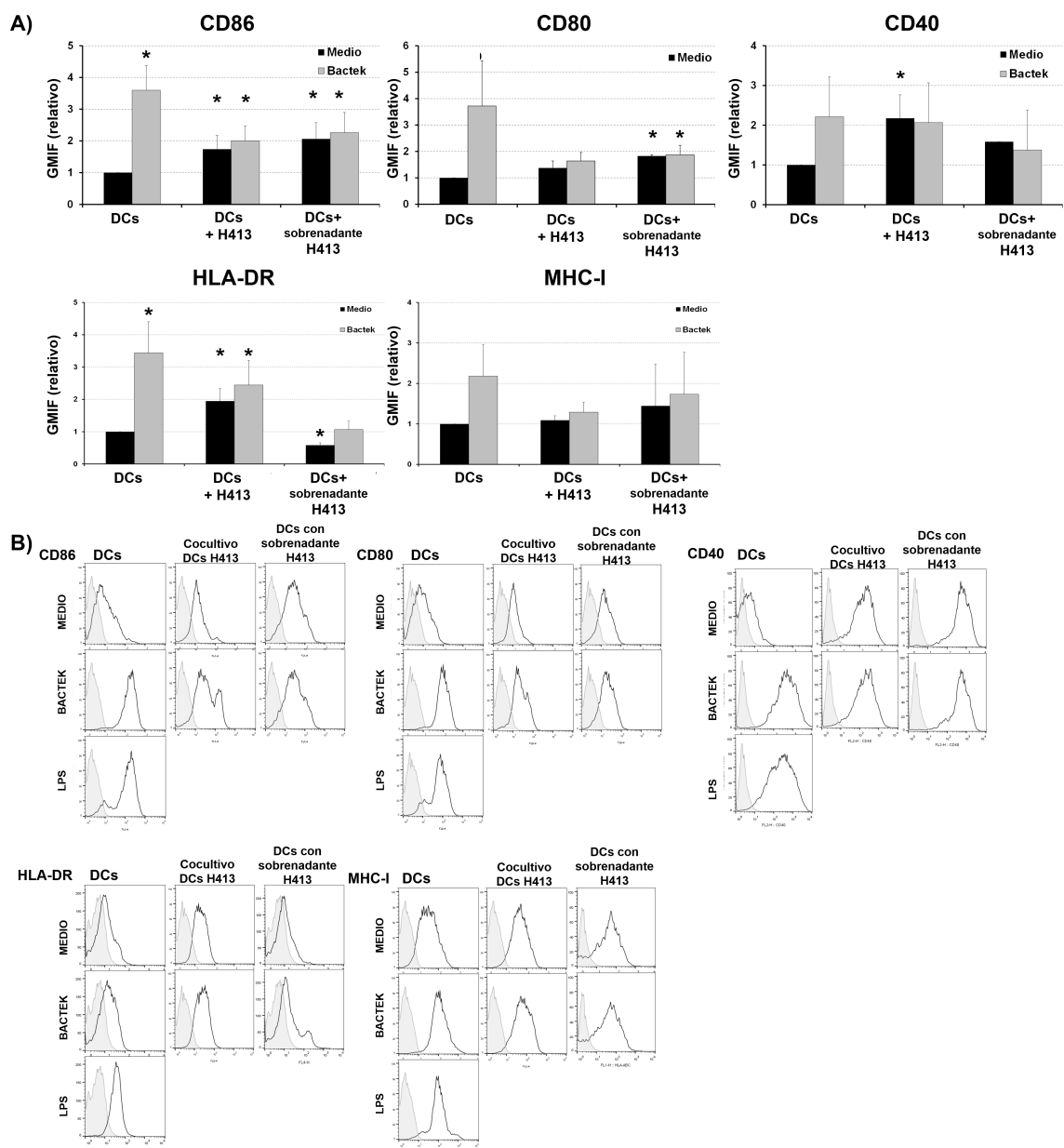


Figura 10 *Expresión de marcadores de maduración en las DCs por citometría.* Medida de la expresión de marcadores de superficie de las DCs en cocultivo o con los sobrenadantes condicionados de H413. A) GMIF relativa a las DCs sin estimular, tratadas con medio (negro) o Bactek (gris). B) Experimento representativo de la expresión de cada uno de estos marcadores (en gris está representado el control de isotipo y en negro el marcaje en estudio).

RESULTADOS

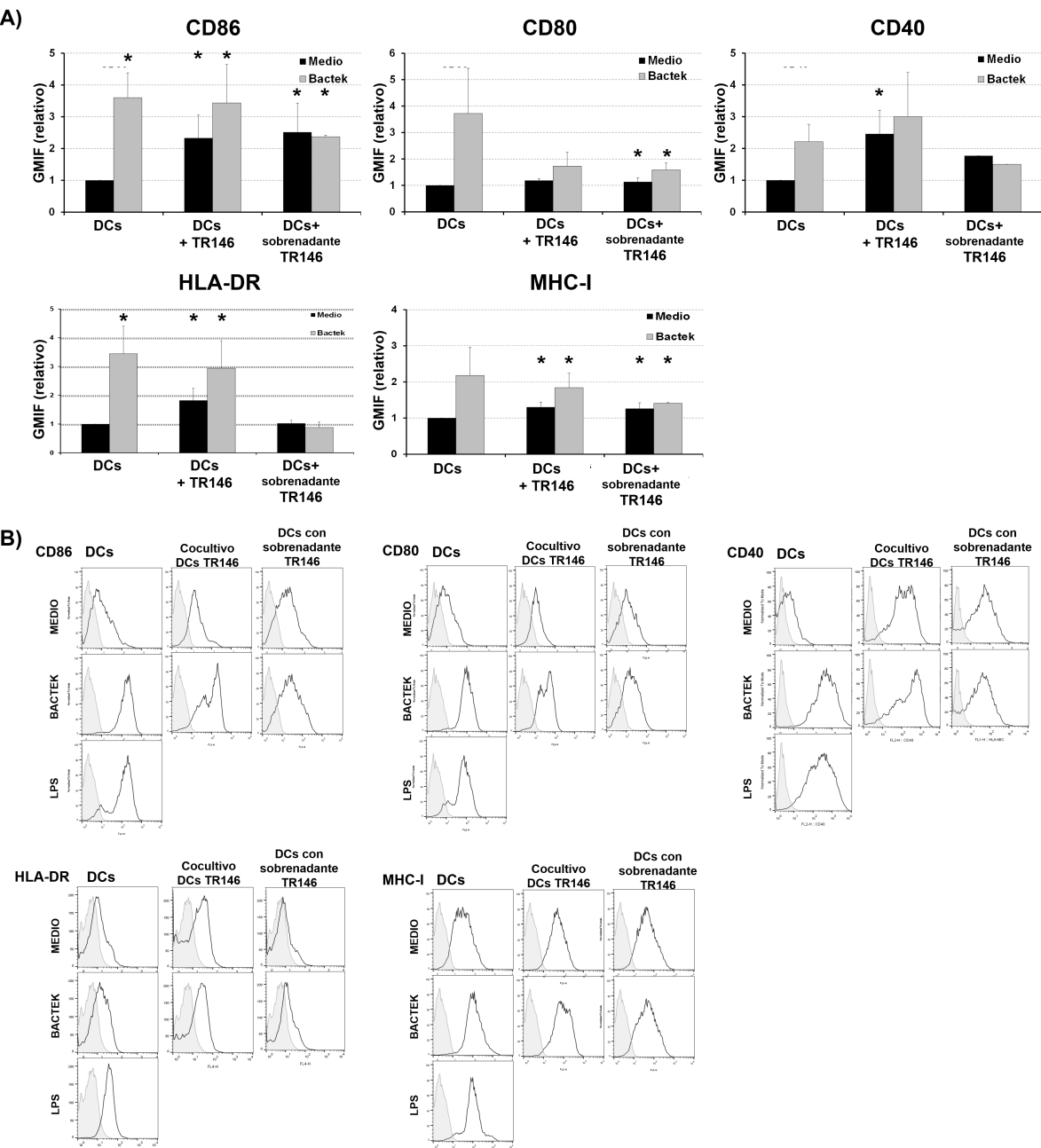


Figura 11. Expresión de marcadores de maduración en las DCs por citometría. Medida de la expresión de marcadores de superficie de las DCs en cocultivo o con los sobrenadantes condicionados de TR146. A) GMIF relativa a las DCs sin estimular, tratadas con medio (negro) o Bactek (gris). B) Experimento representativo de la expresión de cada uno de estos marcadores (en gris está representado el control de isotipo y en negro el marcaje en estudio).

Por último, las DCs condicionadas con ECs primarias, directamente o indirectamente, tuvieron un comportamiento similar al descrito para las DCs condicionadas por H413. Las DCs en ausencia de Bactek® expresan niveles de CD86, CD80 y HLA-DR mayores que las correspondientes DCs sin condicionar con células epiteliales. Además, el tratamiento de las DCs condicionadas con Bactek®, no parece tener efecto (Fig. 12).

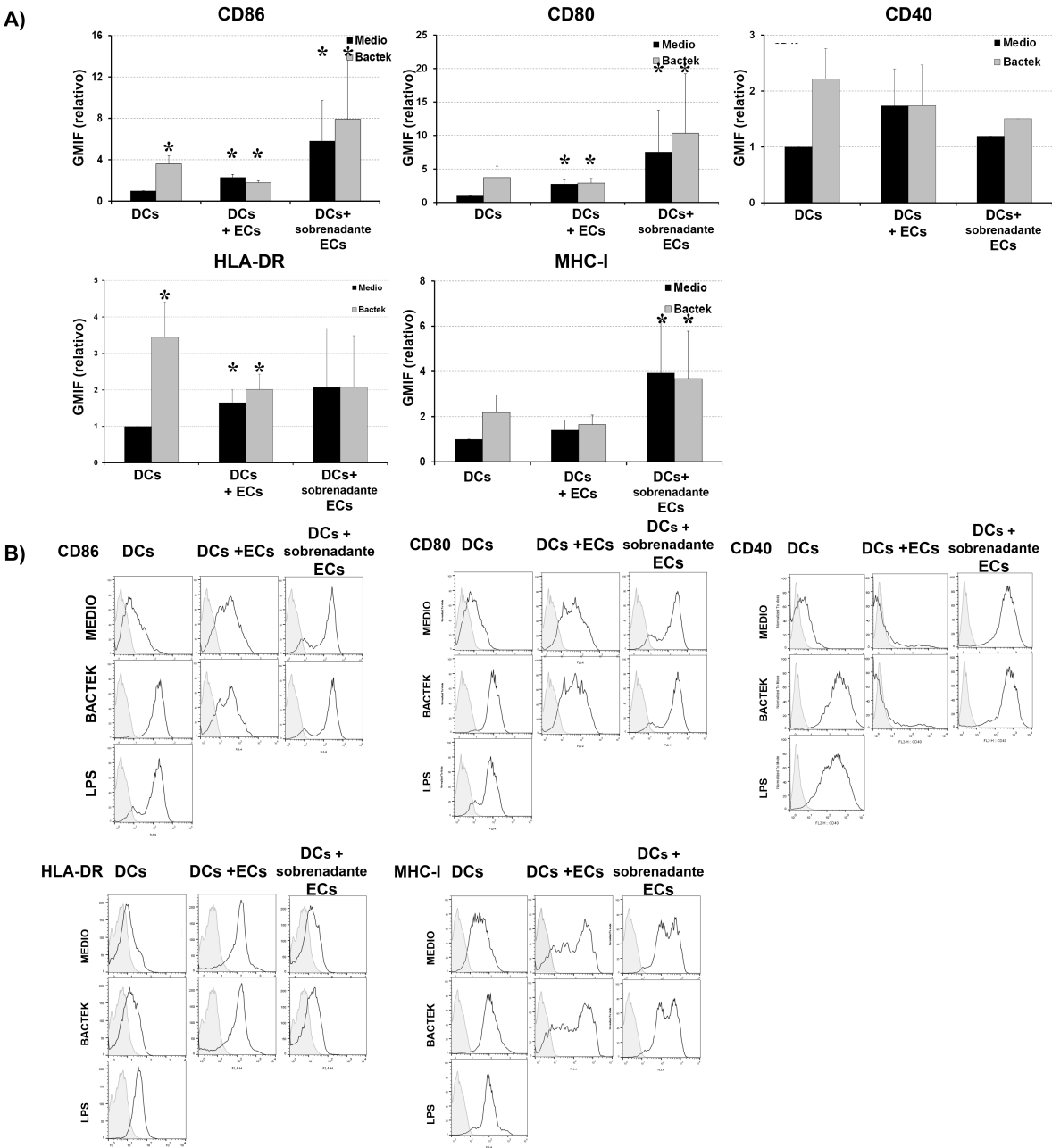


Figura 12. Expresión de marcadores de maduración en las DCs por citometría. Medida de la expresión de marcadores de superficie de las DCs en cocultivo o con los sobrenadantes condicionados de células epiteliales primarias de la mucosa oral. A) GMIF relativa a las DCs sin estimular, tratadas con medio (negro) o Bactek (gris). B) Experimento representativo de la expresión de cada uno de estos marcadores (en gris está representado el control de isotipo y en negro el marcaje en estudio).

El cocultivo de DC y EC no es capaz de madurar completamente a la DC, ya que en ninguno de los casos hemos observado el incremento de todos los marcadores. Es sorprendente que en cocultivo, tanto con la línea H413 como con las células epiteliales primarias, Bactek® no ejerza ningún efecto sobre la maduración de las DCs. Sin embargo, los sobrenadantes condicionados por las ECs son capaces de modificar la expresión de distintos marcadores de superficie de las DCs, siendo capaces de madurarlas aunque no se llegue a alcanzar los niveles de expresión en DCs tratadas con Bactek® o LPS.

RESULTADOS

2.1.2. Producción de citoquinas por las DCs condicionadas por las ECs

En paralelo al análisis de los marcadores de maduración de las DCs en presencia de ECs, se analizó la presencia de citoquinas liberadas al medio en dichos cocultivos mediante ELISA (Fig 9). Las citoquinas analizadas (IL6, IL1β, IL12, IL8, TNFα, IL10, TGFβ) son típicas de la inmunidad innata y son capaces de condicionar la diferenciación de los linfocitos T CD4 con distintos fenotipos.

Como se observa en la figura 13, las células dendríticas sin condicionamiento epitelial secretaron en ausencia de estímulo bajos niveles de las citoquinas analizadas con la excepción de IL8 (casi 3000pg/ml). En presencia de Bactek® las DCs incrementa enormemente la producción de IL6 (hasta 18000pg/ml), TNFα (hasta 2000pg/ml), IL12 (hasta 8000pg/ml) e IL10 (hasta 200pg/ml) y disminuye ligeramente la de TGFβ. Al cocultivar las DCs en presencia de la línea H413 la producción de todas las citoquinas es mínima excepto la de IL1β, que aumenta al tratar con Bactek®. En el caso del cultivo de las DCs con los medios condicionados por las H413, solo observamos niveles significativos de IL6 en ausencia de Bactek® y curiosamente disminuye en la condición con el preparado bacteriano.

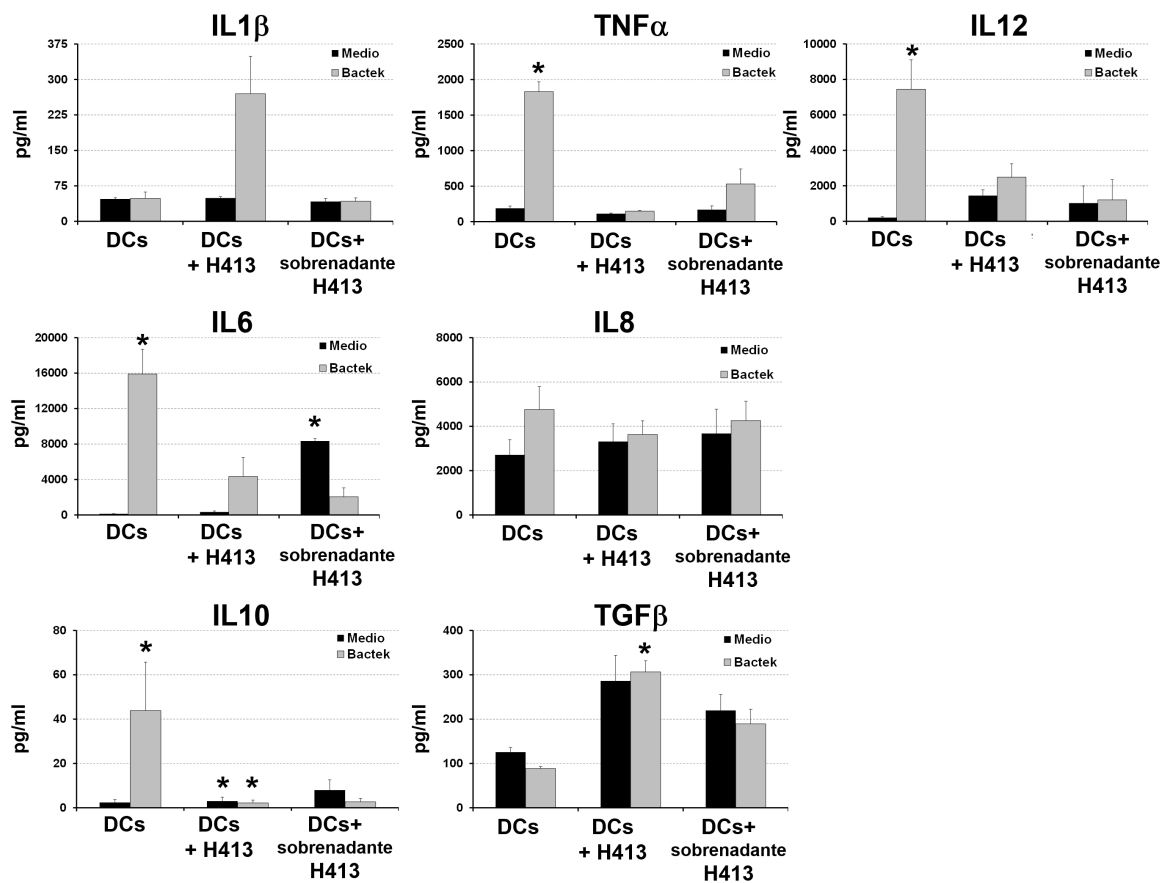


Figura 13. Producción de citoquinas por DCs condicionadas por H413. Análisis por ELISA de la secreción de citoquinas indicadas por DCs en las siguientes condiciones: en medio, en cocultivo H413 o con el medio condicionado de H413. Las barras en gris representan el cultivo de células con Bactek®, mientras que en negro representan cultivos de células en medio

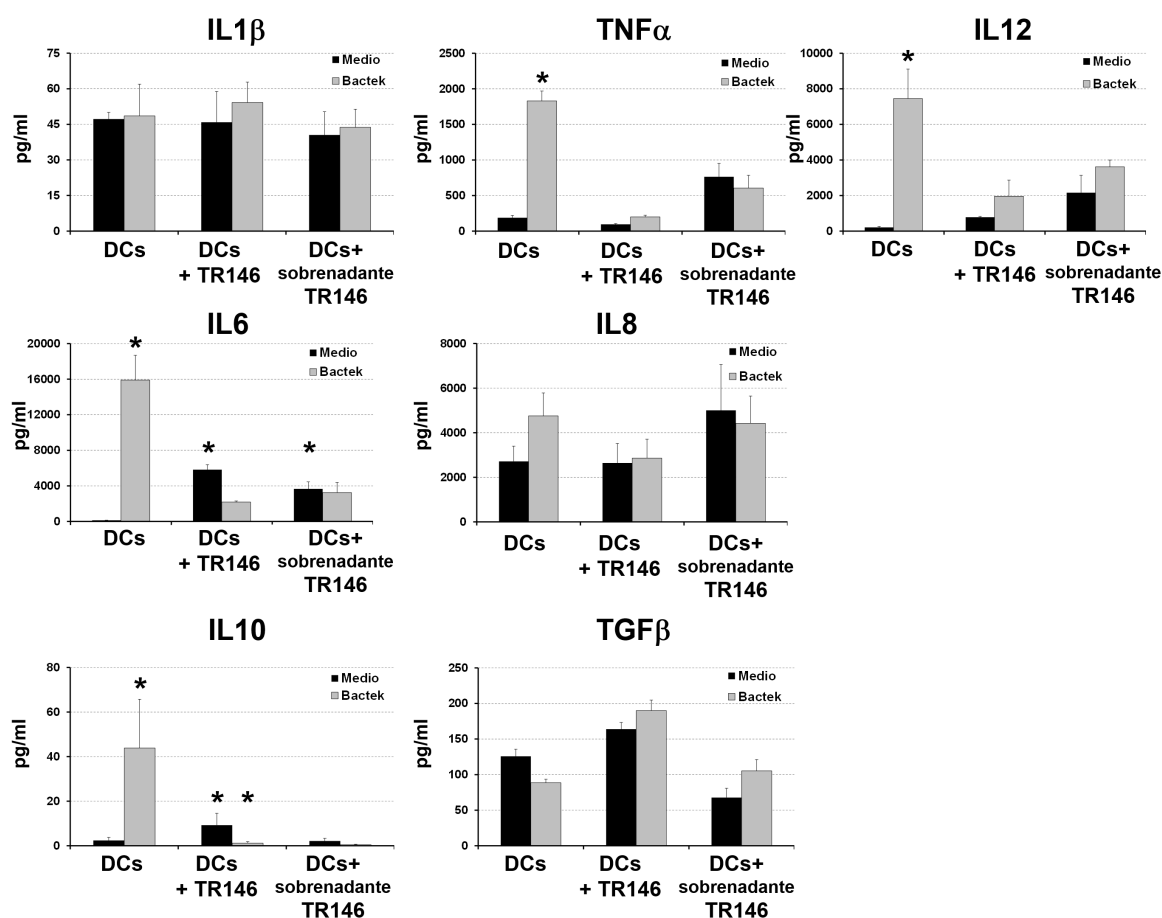


Figura 14. Producción de citoquinas por DCs condicionadas por TR146. Análisis por ELISA de la secreción de citoquinas indicadas por DCs en las siguientes condiciones: en medio, en cocultivo TR146 o con el medio condicionado de H413. Las barras en gris representan el cultivo de células con Bactek®, mientras que en negro representan cultivos de células en medio

Al contrario de las DCs sin condicionar, las DCs condicionadas directamente, en co-cultivo, con células TR146 (Fig 14) tratadas con Bactek® no producen cantidades significativas de citoquinas inflamatorias IL-6, IL-12 TNF α o IL10..Este mismo efecto se observa en la DCs cultivados con medios condicionados de células TR146. Las DCs cultivadas con medio condicionado de TR146, incrementan significativamente la producción de IL8. En general la presencia de Bactek® no produce grandes diferencias en la respuesta de la DC condicionada por la TR146 o su medio de cultivo.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos con ECs primarias difieren cualitativamente a los obtenidos con el resto de líneas epiteliales con respecto a la producción de IL1 β y TNF α . Así, las DCs en presencia de ECs primarias producen cantidades muy significativas de IL1 β (>1200pg/ml) y también de TNF α (3000pg/ml) (Fig.15), independientemente de la estimulación con Bactek®. Como en los casos anteriores la estimulación con Bactek® no es capaz de incrementar la producción de IL12 e IL6. Estos mismos resultados se observan cuando las DCs se cultivan con medios condicionados de ECs con la excepción de la IL1 β , cuya presencia es indetectable.

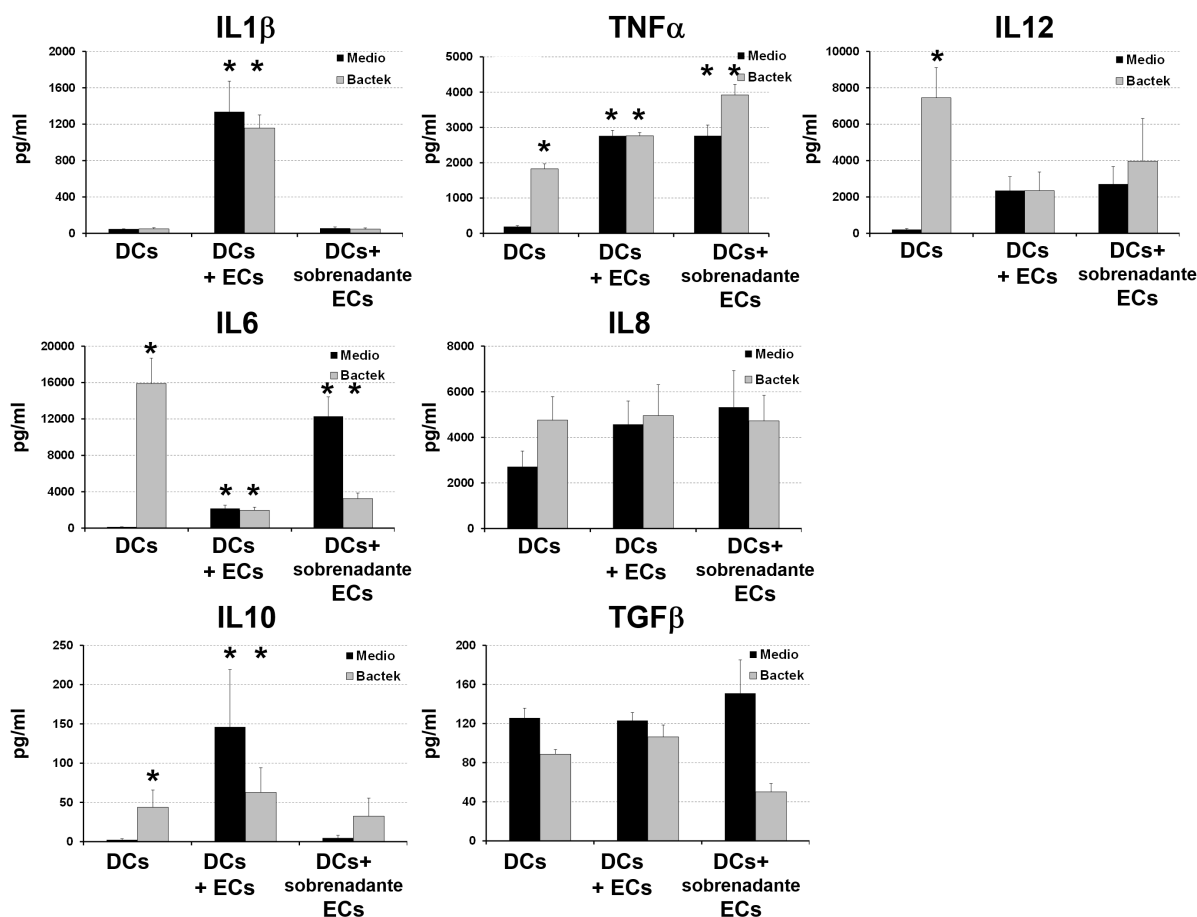


Figura 15. Producción de citoquinas por DCs condicionadas por células epiteliales primarias. Análisis por ELISA de la secreción de citoquinas indicadas por DCs en las siguientes condiciones: en medio, en cocultivo ECs primarias o con el medio condicionado de ECs primarias. Las barras en gris representan el cultivo de células con Bactek®, mientras que en negro representan cultivos de células en medio.

En conjunto los datos indican que el cultivo directo de la célula epitelial con la DC así como, el cultivo de las DCs con el sobrenadante condicionado por las ECs atenúa el efecto activador de Bactek® ya que en la mayoría de las citoquinas medidas no se observan diferencias significativas entre las estimuladas y las no.

2.2. Respuesta de linfocitos T CD4 diferenciados con DCs condicionadas con células epiteliales

Las DCs son las APCs que tienen mayor capacidad para estimular linfocitos T naïve y condicionar su diferenciación, particularmente la de los linfocitos T CD4. Por ello, en este trabajo hemos comparado el fenotipo de LT CD naïve alogénicos estimulados y expandidos con DCs en presencia o ausencia de células epiteliales y de Bactek® en los cultivos (Fig. 16). Estos experimentos se han realizado con los tres tipos de células epiteliales (H413, TR146 y ECs primarias de la mucosa oral). Para caracterizar los LT CD4 estimulados se ha analizado por ELISA la producción de citoquinas: IFN γ , TNF α , IL6, IL4, TGF β e IL10. Además analizamos por tinción intracelular y citometría la expresión factor de transcripción FoxP3 con el objeto de determinar si los linfocitos T CD4 se estaban diferenciando a linfocitos T reguladores.

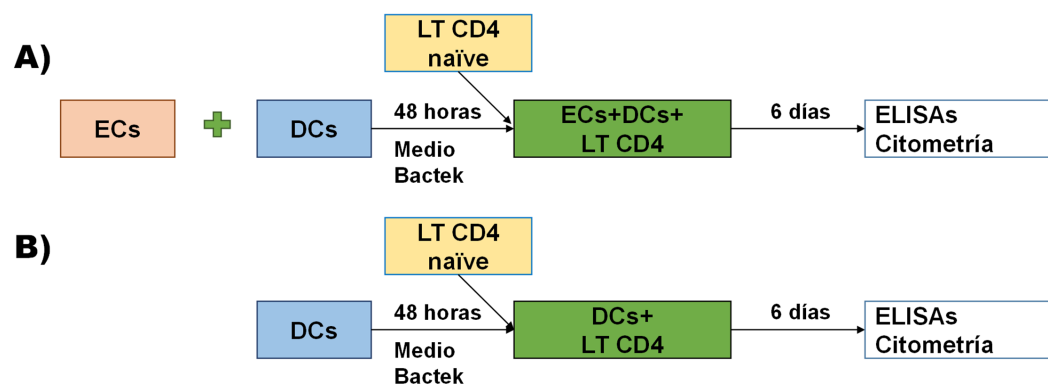


Figura 16. Esquema de la metodología seguida para determinar la diferenciación de LT CD4. A) Co-cultivos de ECs y DCs durante 48 horas con medio o Bactek®, para después cultivar con LT CD4 naïve. B) Cultivos de DCs tratadas en medio o Bactek® para después cultivar con LT CD4 naïve

Tal y como describimos en la introducción, la mucosa oral es un lugar rico en linfocitos CD4, siendo estos los linfocitos mayoritarios, jugando un papel muy importante en la inmunidad de la mucosa y la tolerancia [81] . Por ello decidimos estudiar hacia que fenotipo se polarizan los linfocitos T CD4 naïve al ponerse en contacto con las DCs condicionadas por las ECs.

Como se muestra en la figura 17, los LT CD4 estimulados con las DCs sin células epiteliales producen grandes cantidades de IFN γ (>12000pg/ml), de IL6 (20000 pg/ml), que aumentan al estimularlos con Bactek®. También producen cantidades moderadas de TNF α y casi indetectables de TGF β e IL4, que no cambian al incluir Bactek® al medio. Estos resultados indican que los LT CD4 se estimularon en ausencia de Bactek® debido probablemente a una activación alogénica.

Cuando analizamos los cocultivos de LT CD4 estimulados en presencia de células H413 (Fig 17) encontramos los mismos niveles de TNF α , IL6, TGF β e IL10, que encontrábamos en el cultivo de DC y LT CD4. Sin embargo, los niveles de IFN γ disminuyen significativamente siendo casi indetectable, incluso con la presencia de Bactek®.

RESULTADOS

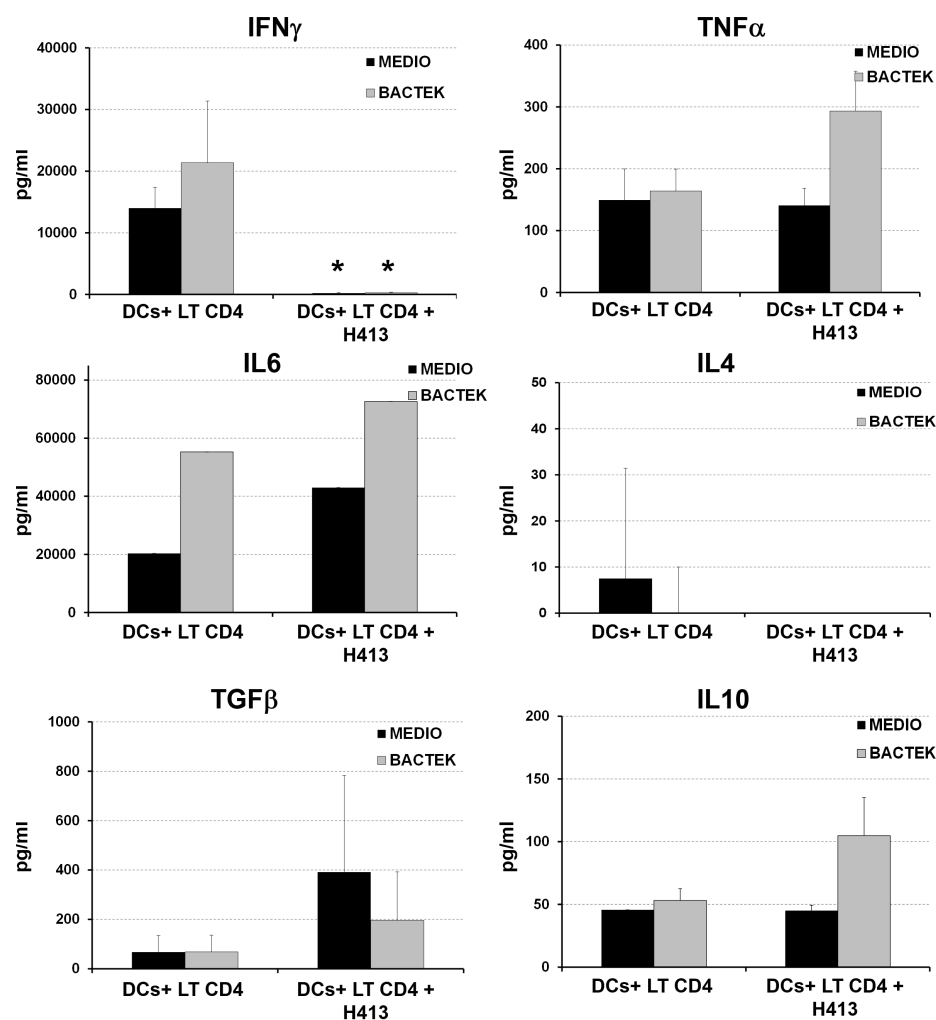


Figura 17. Citoquinas en cultivos de DCs y linfocitos T naïve en presencia o no de H413. Análisis por ELISA de la secreción de citoquinas indicadas por DCs y LT CD4 naïve con en medio (negro) o Bactek® (gris), en ausencia de ECs o en presencia de H413. (n=3)

Cuando estimulamos los LT CD4 con DCs en presencia de la línea celular TR146 (Fig.18) la producción de IFN γ es casi indetectable con o sin Bactek®. También observamos que la secreción de IL6 es mucho menor que la que se observa sin la presencia de la TR146.

En los cultivos de LT CD4 estimulados con DCs en presencia ECs primarias de la mucosa oral (Fig 19), se reproducen algunas de las observaciones obtenidas usando las líneas H413 y TR146. Comparando con los LT estimulados en ausencia de ECs, de nuevo observamos cantidades muy bajas de IFN γ y de IL6, incluso en la presencia de Bactek® en los cultivos con las ECs primarias. A diferencia de los observamos en los cultivos de LT CD4 estimulados con DCs en ausencia y presencia de las líneas epiteliales H413 y TR146, los niveles detectados TNF α y IL10 superan los 1500 pg/ml y aumentan en presencia Bactek®.

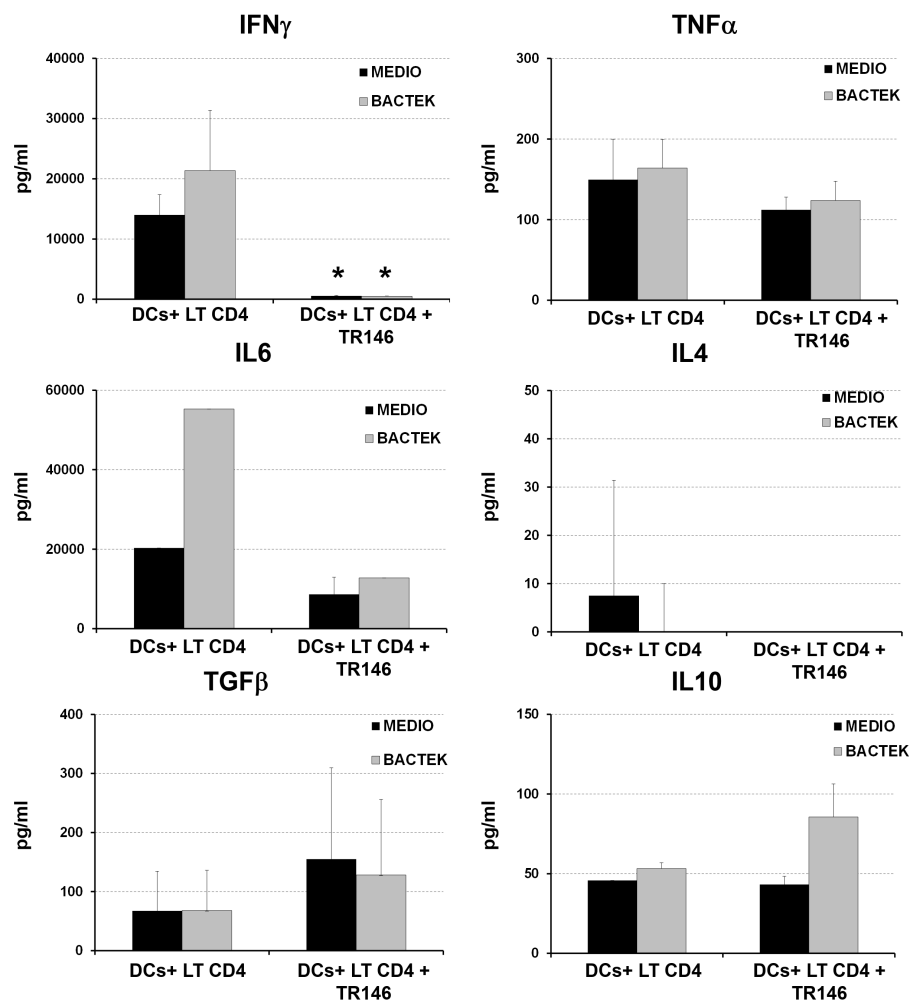


Figura 18. Citoquinas en cultivos de DCs y linfocitos T naïve en presencia o no de TR146. Análisis por ELISA de la secreción de citoquinas indicadas por DCs y LT CD4 naïve con en medio (negro) o Bactek® (gris), en ausencia de ECs o en presencia de TR146 (n=3).

Nuestros resultados indican los LT CD4 estimuladas con DC en presencia de Bactek® se diferencian a un fenotipo productor de IFN γ , posiblemente Th1. En cambio cuando se estimulan en presencia de células epiteliales orales, el IFN γ es prácticamente indetectable indicativo de que posiblemente estos linfocitos no se estén diferenciando a Th1. Además descartamos que se diferencien a Th2 porque la producción de IL4 es indetectable. En los cultivos de LT CD4 estimulados en presencia de ECs primarias se observa también niveles altos de TNF α y de IL10.

RESULTADOS

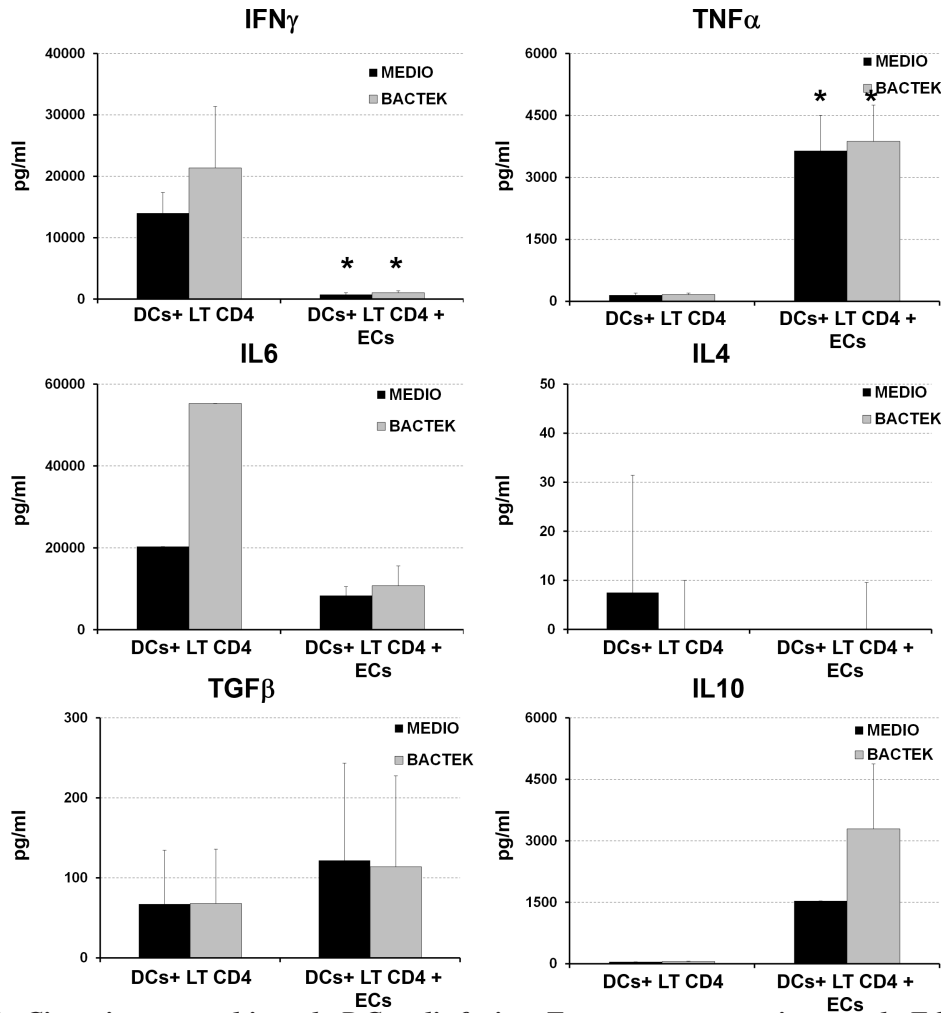


Figura 19. Citoquinas en cultivos de DCs y linfocitos T naïve en presencia o no de ECs primarias. Análisis por ELISA de la secreción de citoquinas indicadas por DCs y LT CD4 naïve con en medio (negro) o Bactek® (gris), en ausencia de ECs o en presencia de ECs primarias.

En cuanto al análisis de marcadores de LT CD4, nos centramos en el análisis de CD25⁺ (marcador de activación) y FoxP3 (Treg). Los resultados aparecen reflejados en la figura 20. En los LT CD4 estimulados con DC en ausencia de ECs observamos que el 37% están activados, expresan CD25 y el 1 % son FOXP3⁺ (Fig 21A). Estas poblaciones se mantienen cuando las células se tratan con Bactek®. En los LT CD4 estimulados en presencia de la líneas epiteliales la población CD25 representa tan solo el 8% y la población CD25⁺FoxP3⁺ sobre un 5% (Fig.21 BC). Estas poblaciones no se alteran con el tratamiento con Bactek®. En cambio, en los LT CD4 estimulados en presencia de ECs primaria las población CD25⁺ y CD25⁺FoxP3⁺ representan el 37% y el 14%, respectivamente.

Nuestros estudios muestran que los LT CD4 parecen no completar su diferenciación a Th1, ya que la citoquina estrella de estos linfocitos, IFN γ , se ve reducida hasta niveles casi indetectables, tampoco se diferencian a Th2, ya que no hemos detectado IL4 en ninguno de los cocultivos. Hay un porcentaje de linfocitos que se diferencias a Treg, esto está en consonancia con estudios anteriores que describen que existe entre 10-15% de Treg en la mucosa [81].

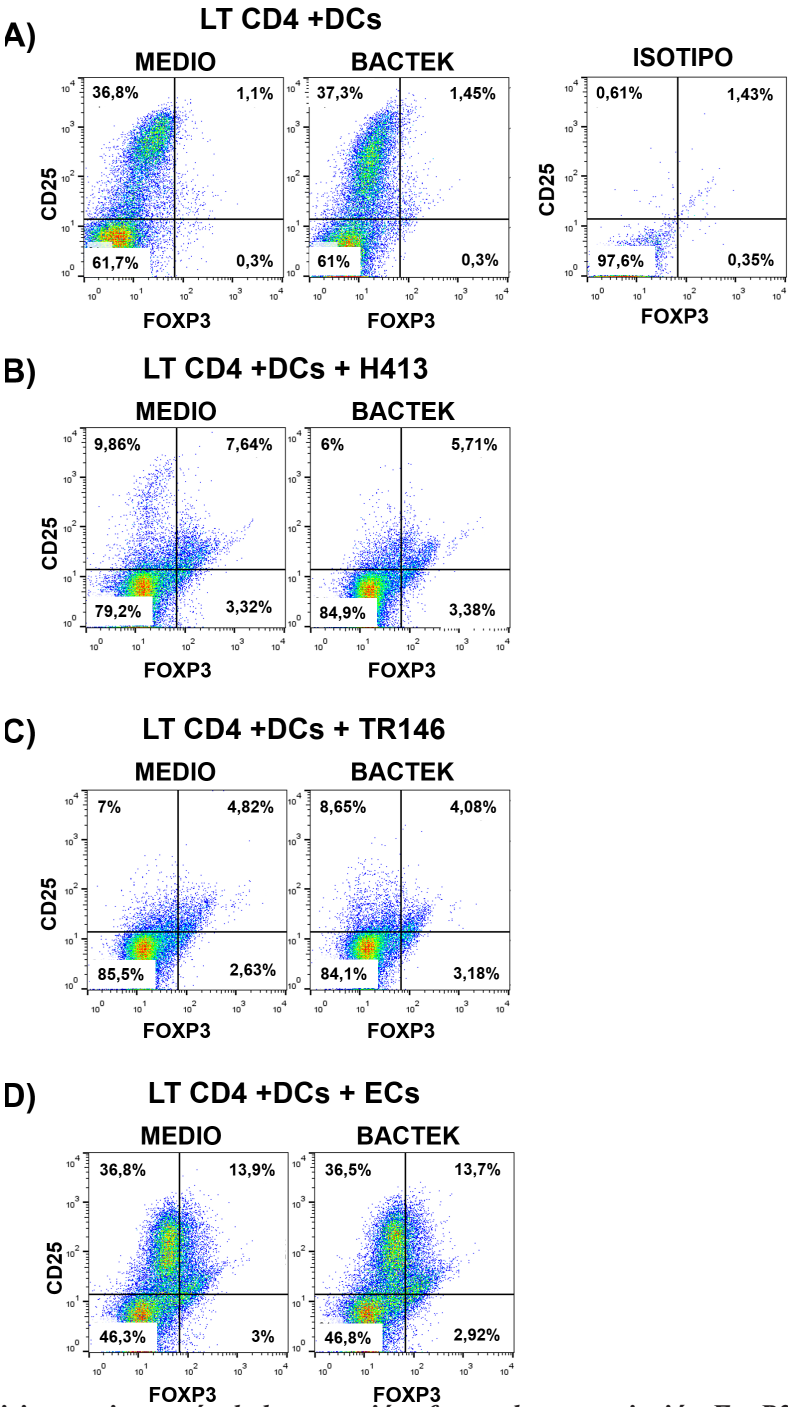


Figura 20. Análisis por citometría de la expresión factor de transcripción FoxP3. En las gráficas se muestra la expresión del marcador de activación CD25 (ordenadas) y del factor de transcripción FOXP3 (abscisas) en LT CD4 .Experimento representativo de tres. En el panel A la doble expresión del control de isotipo, y de las LT CD4 en cultivos con las DCs en medio o Bactek. B) Cocultivo de LT CD4 con DCs y H413. C) Cocultivo de LT CD4 con DCs y TR146. D) Cocultivo de LT CD4 con DCs y ECs primarias de la mucosa oral

RESULTADOS

3. Estudio de la respuesta de las células T CD4 estimuladas en presencia las células epite-
liales de la mucosa oral

Dado que las células epiteliales expresan marcadores típicos de APC y citoquinas moduladoras, estudiamos la interacción y el efecto condicionante de las ECs de forma directa sobre LT CD4, sin la presencia de DCs. Para sustituir a las DCs los LT CD4 se activaron con antiCD3 y antiCD28 (Fig 21) siguiendo el protocolo de otros estudios [129]. El efecto modulador de las células epiteliales se estudió realizando las estimulaciones de los LT CD4 en cultivo con las ECs, con o sin Bactek®, y con medio

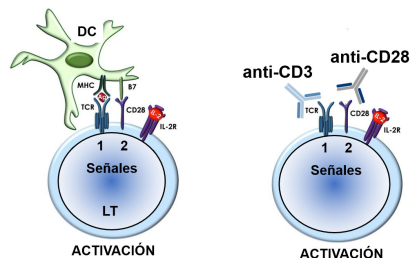


Figura 21. Modelo de activación de los linfocitos T. Las señales de activación (1 y 2) que proporciona la célula dendrítica pueden ser sustituidas por anti-CD3•y anti-CD28.

condicionado resultantes de cultivos de CE con o sin Bactek®.

3.1. Estudio de la respuesta de linfocitos T CD4 naïve en presencia de células epiteliales de la mu-
cosa oral

Para estudiar el condicionamiento de los LT CD4 naïve en presencia de la célula epitelial, se llevó a cabo según dos aproximaciones (Fig.22). La primera fue analizar el efecto del contacto directo de la célula epitelial junto con el LT CD4 naïve con o sin Bactek®. Y la segunda mediante el cultivo de los LT CD4 con medios condicionados previamente por las ECs primarias, H413 o TR146 con o sin Bactek®.

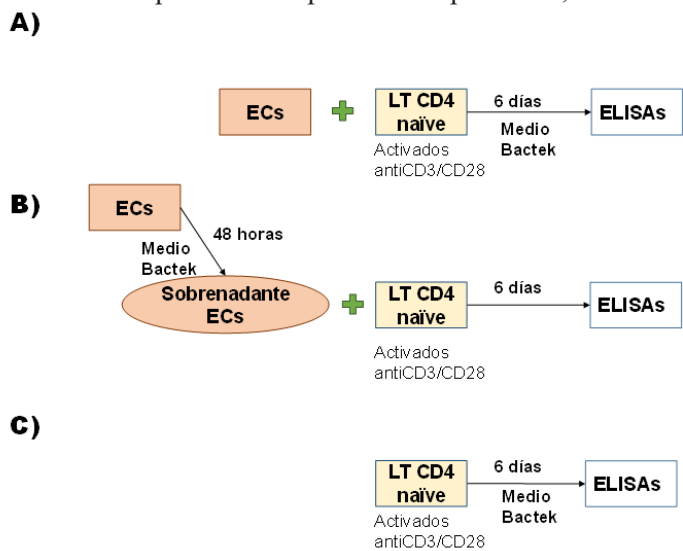


Figura 22. Esquema representativo de la metodología utilizada. A) Cocultivos de ECs y LT CD4 naïve activados con antiCD3 y antiCD28 con o sin Bactek® para después medir por ELISA los sobrenadantes tras 6 días de cultivo. B) Cultivos de LT CD4 naïve activados con antiCD3 y antiCD28 junto con sobrenadantes de ECs condicionados previamente con medio o Bactek®. C) Cultivos de LT CD4 naïve activados con medio o Bactek® durante 48 horas para recoger su sobrenadante y medir la producción de citoquinas por ELISA.

Como control se cultivaron en las mismas condiciones LT CD4 naïve sin la presencia de la EC. Tras 6 días de cultivo se recogieron los sobrenadantes y se midieron por ELISA las citoquinas: IFN γ , TNF α , IL2, IL4, TGF β e IL10.

Los linfocitos T CD4 naïve que han estado activados sin la presencia de la EC, secretan grandes cantidades de IFN γ (10000 pg/ml), de TNF α e IL2 (>3000 pg/ml). El tratamiento con Bactek® incrementa más del doble de los niveles de IFN γ (Fig 23). Al analizar los cocultivos de las LT CD4 naïve en presencia de células H413, encontramos disminuidos drásticamente los niveles de IFN γ y de TNF α e incrementados incremento en los niveles de TGF β e IL2, respecto a los LT CD4 sin la presencia de la EC, incluso con la presencia de Bactek®. En los cultivos con los medios condicionados por las H413 no se observa ningún cambio en las citoquinas liberadas respecto a las LT CD4 naïve cultivadas sin las ECs.

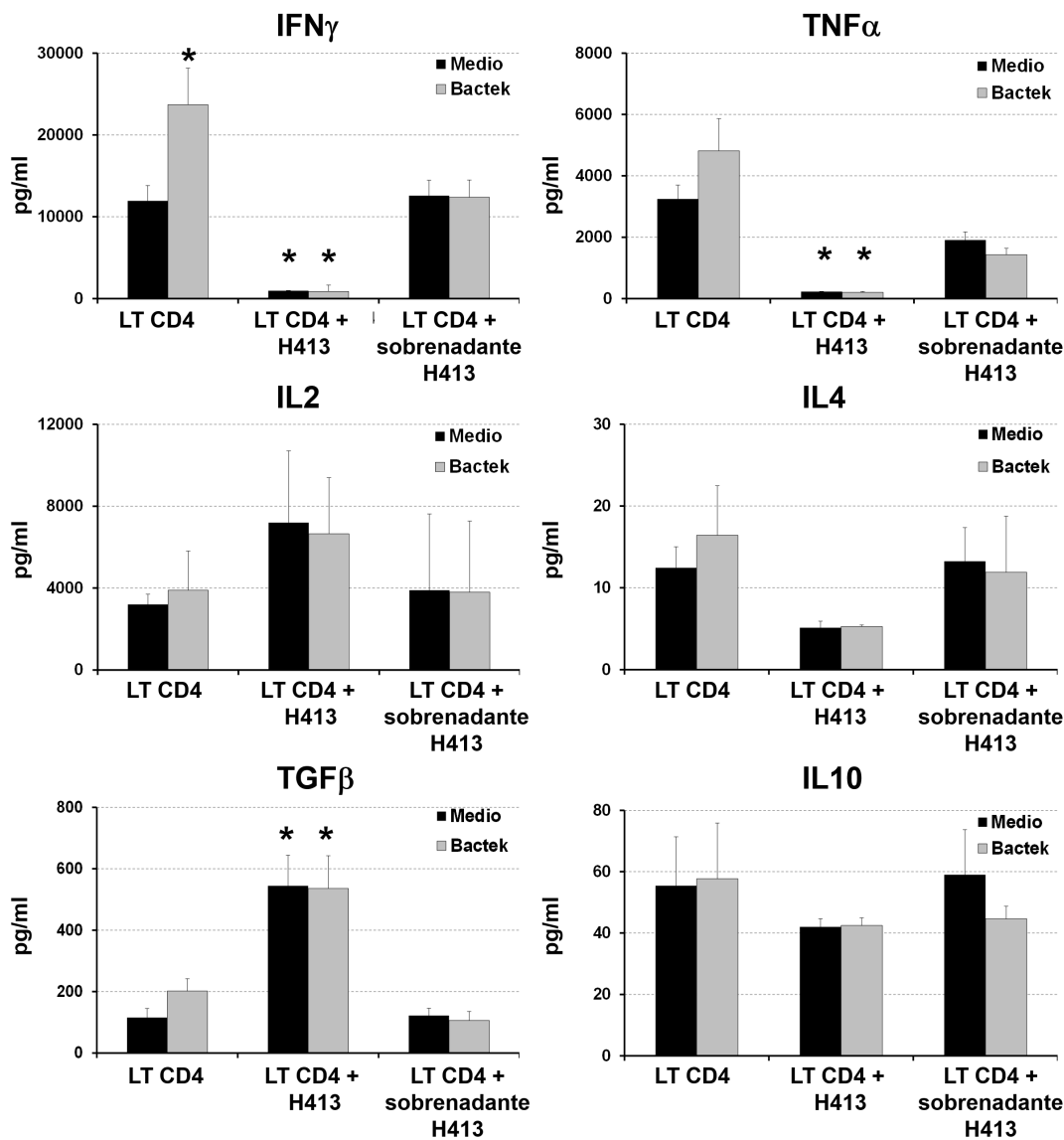


Figura 23. Citoquinas por linfocitos T naïve condicionados por H413. Análisis por ELISA de la secreción de citoquinas indicadas por LT CD4 naïve activados con antiCD3•y antiCD28 en las siguientes condiciones: en cultivo en medio, en cocultivo H413 o con el medio condicionado de H413. Las barras en gris representan el cultivo de células con Bactek®, mientras que en negro representan cultivos de células en medio.

RESULTADOS

Los sobrenadante de los LT CD4 cultivados con la línea TR146 (fig. 24), también muestran una disminución significativa de los niveles de IFN γ y TNF α y el incremento de la producción de TGF β , no encontrando diferencias al estimular con Bactek®. En los cultivos de los LT CD4 con los medios condicionados por las ECs, solo se observa un descenso independiente del tratamiento con Bactek® en los niveles de IL2.

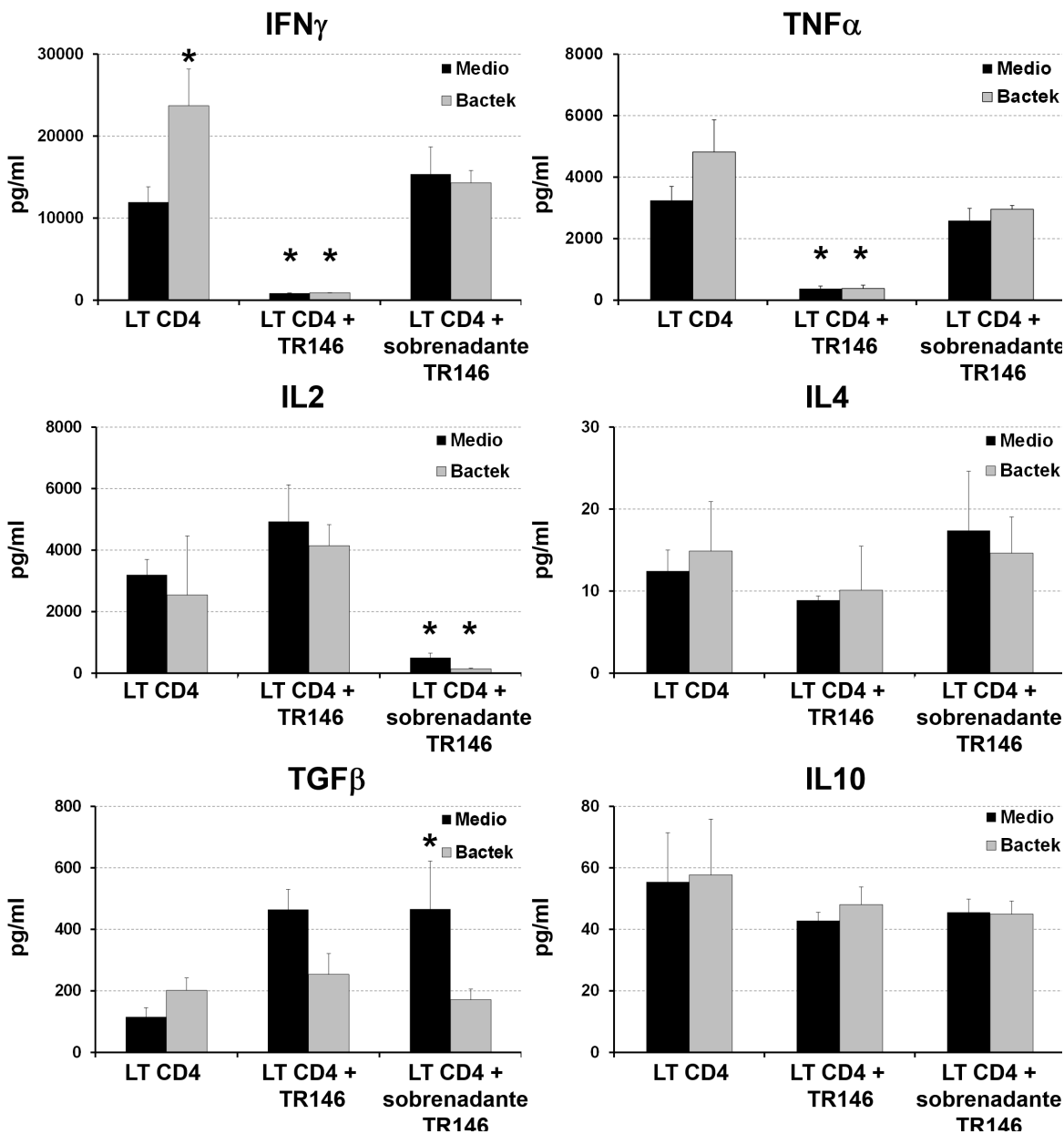


Figura 24. Producción de citoquinas por linfocitos *T* naïve condicionados por TR146. Análisis por ELISA de la secreción de citoquinas indicadas por LT CD4 naïve activados con antiCD3•y antiCD28 en las siguientes condiciones: en medio, en cocultivo H413 o con el medio condicionado de H413. Las barras en gris representan el cultivo de células con Bactek®, mientras que en negro representan cultivos de células en medio.

En el caso de los LT CD4 naïve cultivados en presencia de las ECs primarias de la mucosa oral (Fig.25) se produce disminución de IFN γ , incluso con el tratamiento con Bactek®.

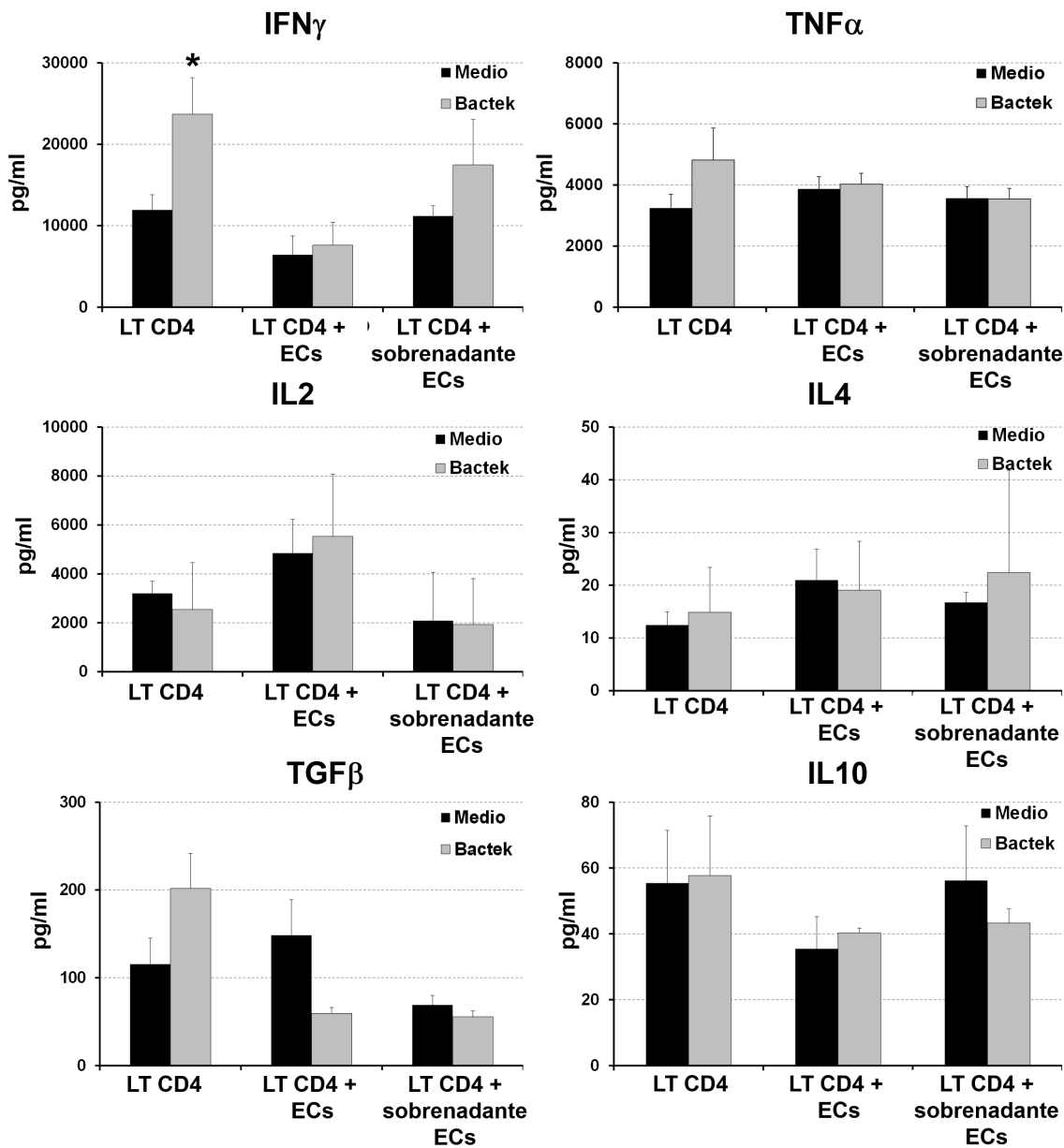


Figura 25. Producción de citoquinas por linfocitos *T* naïve condicionados por ECs primarias. Análisis por ELISA de la secreción de citoquinas indicadas por LT CD4 naïve activados con antiCD3•y antiCD28 en las siguientes condiciones: en medio, en cocultivo H413 o con el medio condicionado de H413. Las barras en gris representan el cultivo de células con Bactek®, mientras que en negro representan cultivos de células en medio.

RESULTADOS

A grandes rasgos, nuestros datos indican que el cultivo de los LT CD4 naïve activados con antiCD3 y anti CD28 produce un fenotipo Th1, determinado por la producción IFN γ e IL2. El contacto de estos linfocitos con la célula epitelial primaria de la mucosa oral induce una reducción drástica en la liberación de IFN γ , y un incremento de TGF β . Esta reducción de IFN γ no va acompañada de un incremento en IL-4 por lo que es poco probable que un cambio de perfil Th1 a Th2 tenga lugar. Por último el efecto que se observa, principalmente inhibiendo la producción de IFN γ , depende del contacto célula epitelial-linfocito T.

3.2 Estudio de la respuesta de linfocitos T CD4 Th1 en presencia de células epiteliales de la mucosa oral

La diferenciación de los LT CD4 en presencia de las células epiteliales de la mucosa oral observamos un descenso drástico de los niveles de IFN γ , citoquina típica de los linfocitos Th1. Por ello nos planteamos estudiar si este efecto sería visible en una población Th1 diferenciada in vitro, por lo que repetimos el mismo tipo de experimento realizado en el apartado 3.1 pero esta vez con células T CD4 Th1. Siguiendo el mismo procedimiento, cocultivamos estos linfocitos CD4 Th1 junto con las células epiteliales: H413, TR146 y ECs primarias de la mucosa oral, con o sin Bactek®, (Fig 26A). También cultivamos los LT CD4 Th1 con medios condicionados por las células epiteliales (Fig 26B). Y por último, como controles de referencias cultivamos los LT CD4 Th1 sin la presencia de la célula epitelial tratadas con o sin Bactek® (Fig 26C). Tras 48 horas de cultivo medimos por ELISA solo las citoquinas que se veían alteradas: IFN γ , TNF α y TGF β .

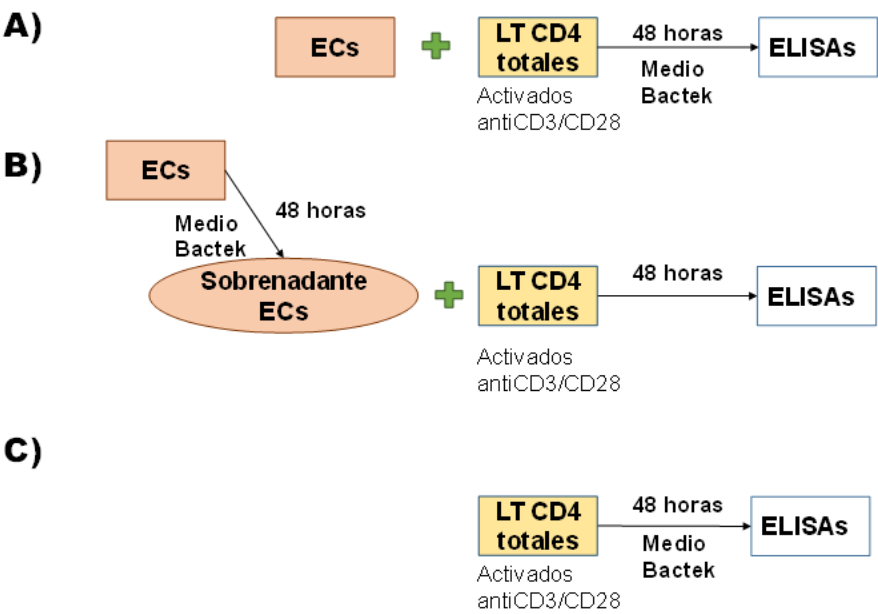


Figura 26. Esquema representativo de la metodología utilizada. A) Cocultivos de ECs y LT CD4 totales activados con antiCD3/CD28 con o sin Bactek® para después medir por ELISA los sobrenadantes tras 48 de cultivo. B) Cultivos de LT CD4 totales activados con antiCD3/CD28 junto con sobrenadantes de ECs condicionados previamente con medio o Bactek®. C) Cultivos de LT CD4 totales activados con medio o Bactek durante 48 horas para recoger su sobrenadante y medir la producción de citoquinas por ELISA.

Los LT CD4 Th1 activados producen una gran cantidad de IFN γ (3000 pg/ml), niveles medios de TNF α (600 pg/ml) y bajos niveles de TGF β (200 pg/ml), sin que se vean afectados por el tratamiento con Bactek® (Fig.27). Al cultivar los LT CD4 Th1 en presencia de las H413, se produce un descenso significativo de IFN γ y de TNF α , sin cambios con el tratamiento con Bactek®. En el caso de los cultivos de LT CD4 Th1 con los medios condicionados por las H413 no se observan cambios en la secreción de estas citoquinas respecto a la que producen los LT CD4 Th1.

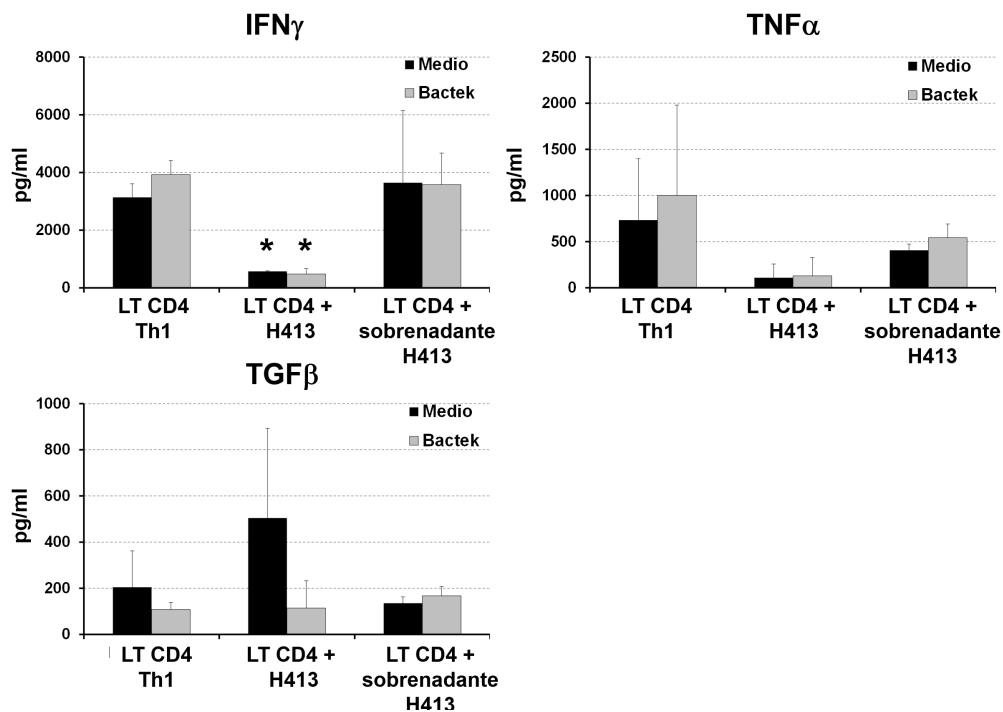


Figura 27. Producción de citoquinas por linfocitos T Th1 condicionados por H413. Análisis por ELISA de la secreción de citoquinas indicadas por LT CD4 Th1 activados con antiCD3•y antiCD28 en las siguientes condiciones: en medio, en cocultivo H413 o con el medio condicionado de H413. Las barras en gris representan el cultivo de células con Bactek®, mientras que en negro representan cultivos de células en medio.

Los cultivos de LT CD4 Th1 con las células TR146, producen una disminución en los niveles de IFN γ , viéndose ligeramente disminuidos los niveles de TNF α , de forma independiente a Bactek® (Fig 28). En los cultivos de los LT CD4 Th1 con los medios condicionados por las TR146, se detecta el incremento en la producción de IFN γ , no observándose diferencias significativas en el resto de condiciones

En el cocultivos de los LT CD4 Th1 con ECs primarias (Fig. 29), solo se observa un incremento significativo en la producción de TNF α cuando es estimulada con Bactek®. No viéndose cambios en el resto de condiciones.

RESULTADOS

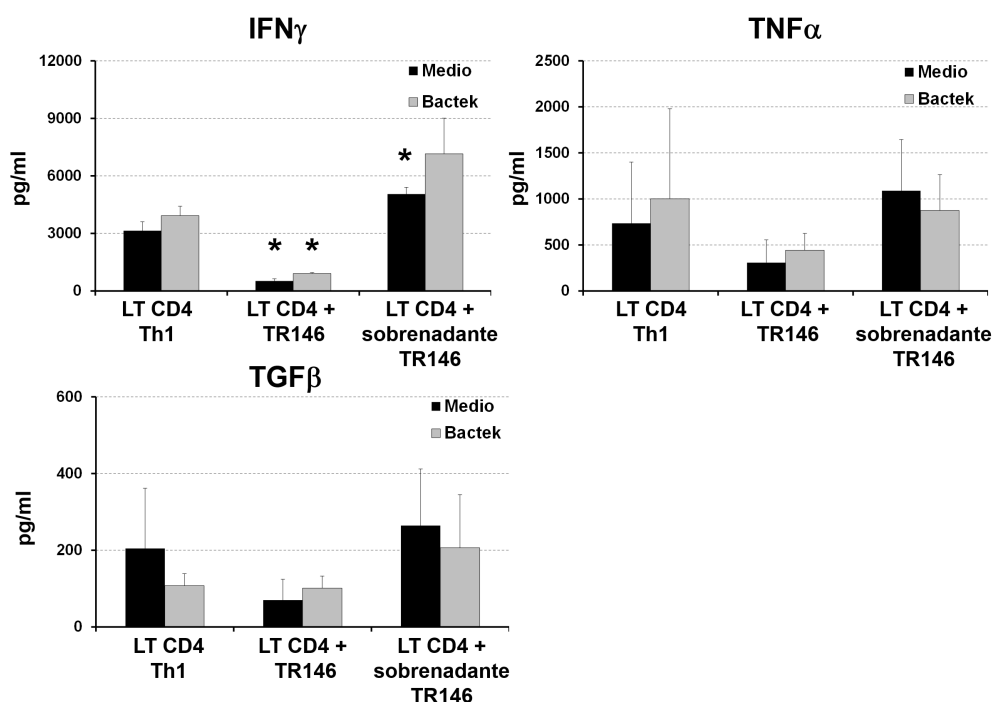


Figura 28. Producción de citoquinas por linfocitos *T Th1* condicionados por TR146. Análisis por ELISA de la secreción de citoquinas indicadas por LT CD4 Th1 activados con antiCD3•y antiCD28 en las siguientes condiciones: en medio, en cocultivo H413 o con el medio condicionado de H413. Las barras en gris representan el cultivo de células con Bactek®, mientras que en negro representan cultivos de células en medio.

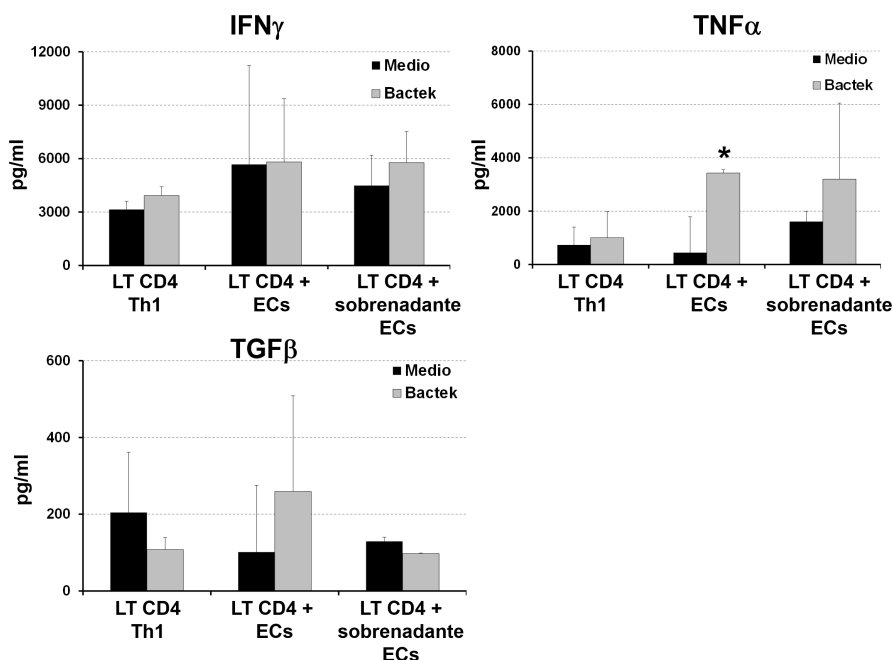


Figura 29. Producción de citoquinas por linfocitos *T Th1* condicionados por ECs primarias. Análisis por ELISA de la secreción de citoquinas indicadas por LT CD4 Th1 activados con antiCD3•y antiCD28 en las siguientes condiciones: en medio, en cocultivo H413 o con el medio condicionado de H413. Las barras en gris representan el cultivo de células con Bactek®, mientras que en negro representan cultivos de células en medio.

Nuestros resultados desvelan que a pesar de que el linfocito T CD4 esté diferenciado a Th1, el contacto directo con la célula epitelial, es capaz de disminuir la cantidad de IFN γ en el medio. Sin embargo no somos capaces de detectar cambios tan claros en la disminución de TNF α o el incremento de TGF β , como lo veíamos en el caso de los cultivos con LT CD4 naïve.

3.3 Estudio de la respuesta de linfocitos T CD4 totales en presencia de células epiteliales de la mucosa oral.

Puesto que no está descrita la composición de clases de LT CD4 no está descrita en la mucosa oral humana [81], estudiamos que ocurría en una población heterogénea de linfocitos T CD4 cuando estuviese en contacto con células epiteliales de la mucosa oral. Siguiendo la metodología anterior, cultivamos los LT CD4 totales junto con las células epiteliales H413, TR146 y células epiteliales primarias de la mucosa oral (Fig.30). También se cultivaron los LT CD4 junto con los medios condicionados por las ECs y los LT CD4 sin presencia de la EC estimulados con o sin Bactek®. Tras 48 horas en cultivo se recogieron los sobrenadantes para analizar por ELISA: IFN γ , TNF α , IL6, IL4, TGF β e IL10.

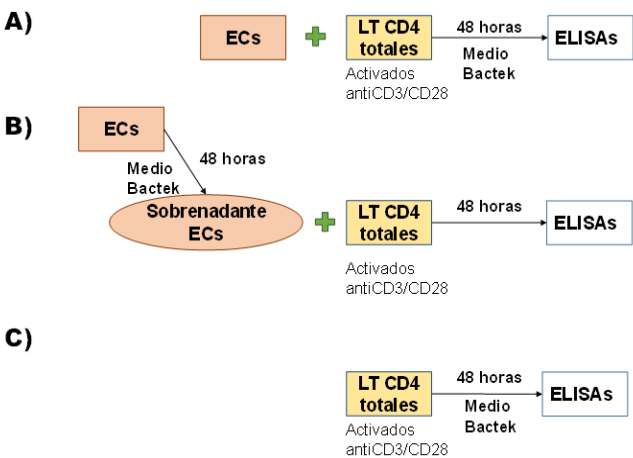


Figura 30. Esquema representativo de la metodología utilizada. A) Cocultivos de ECs y LT CD4 totales activados con antiCD3/CD28 con o sin Bactek® para después medir por ELISA los sobrenadantes tras 48 de cultivo. B) Cultivos de LT CD4 totales activados con antiCD3/CD28 junto con sobrenadantes de ECs condicionados previamente con medio o Bactek®. C) Cultivos de LT CD4 totales activados con medio o Bactek durante 48 horas para recoger su sobrenadante y medir la producción de citoquinas por ELISA relativa de CD25 D) Experimento representativo de la expresión de CD25.

Los LT CD4 totales secretan una alta cantidad de IFN γ (2000 pg/ml) que incrementa con el tratamiento con Bactek® (Fig 31). Al cultivar los LT CD4 con las células H413 los niveles de IFN γ descienden, siendo casi indetectables, los niveles de TNF α disminuyen a la mitad. Sin embargo, los niveles de IL6 y TGF β incrementan, superando los 1500 pg/ml, sin verse afectados por Bactek®. Los LT CD4 cultivados con los medios condicionados por las H413, producen niveles parecidos de IFN γ que los LT CD4 sin condicionar por las ECs. Además observamos un ligero incremento de IL6 que no varía con Bactek® respecto a los LT CD4 sin condicionar por las ECs.

RESULTADOS

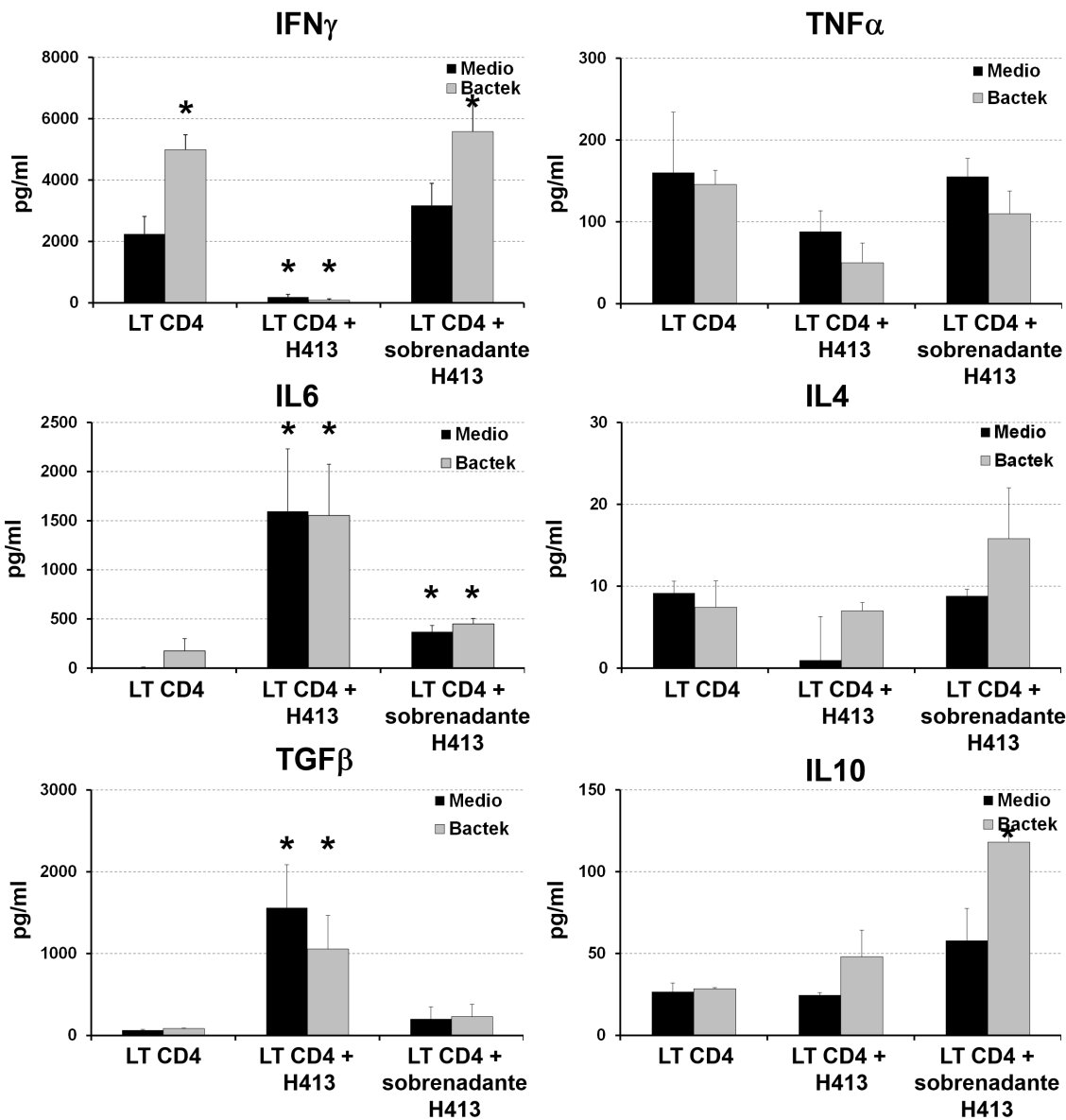


Figura 31. Producción de citoquinas por linfocitos T totales condicionados por H413. Análisis por ELISA de la secreción de citoquinas indicadas por LT CD4 totales activados con antiCD3 y antiCD28 en las siguientes condiciones: en medio, en cocultivo H413 o con el medio condicionado de H413. Las barras en gris representan el cultivo de células con Bactek®, mientras que en negro representan cultivos de células en medio

En los cocultivos de LT CD4 totales con las células TR146 (Fig. 32), observamos una disminución de los niveles de IFN γ , y el incremento en los niveles de IL6 (600 pg/ml) y TGF β (200 pg/ml) respecto a los LT CD4 sin condicionar por las ECs, que es independiente del tratamiento con Bactek®. El cultivo de los LT CD4 totales con los medios condicionados por las TR146, produce un incremento de IL6 respecto a los LT CD4 sin condicionar por las ECs.

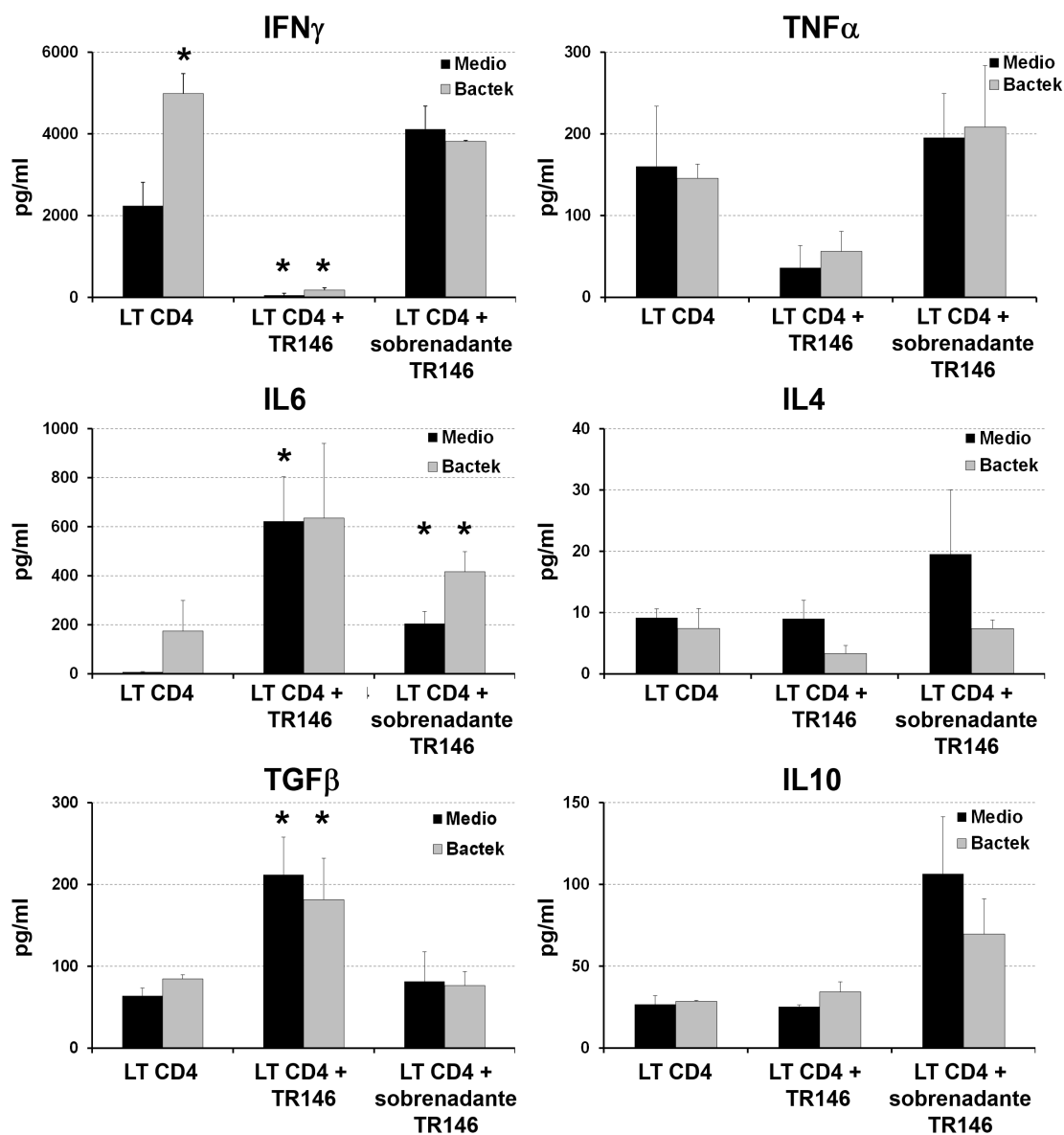


Figura 32. Producción de citoquinas por linfocitos T totales condicionados por TR146. Análisis por ELISA de la secreción de citoquinas indicadas por LT CD4 totales activados con antiCD3•y antiCD28 en las siguientes condiciones: en medio, en cocultivo H413 o con el medio condicionado de H413. Las barras en gris representan el cultivo de células con Bactek®, mientras que en negro representan cultivos de células en medio

Los cocultivos de LT CD4 activados junto con células epiteliales primarias de la mucosa oral muestran (Fig. 33), al igual que en el cocultivo con las líneas epiteliales, muestran un descenso drástico de la producción de IFN γ y TNF α y un incremento de TGF β , independiente de la estimulación con Bactek® en los cocultivos no se observan diferencias significativas. Al cultivar los LT CD4 con los medios condicionados de las células epiteliales primarias, no se observan cambios en la producción de ninguna de las citoquinas analizadas respecto a los LT CD4 sin condicionar por las células epiteliales.

RESULTADOS

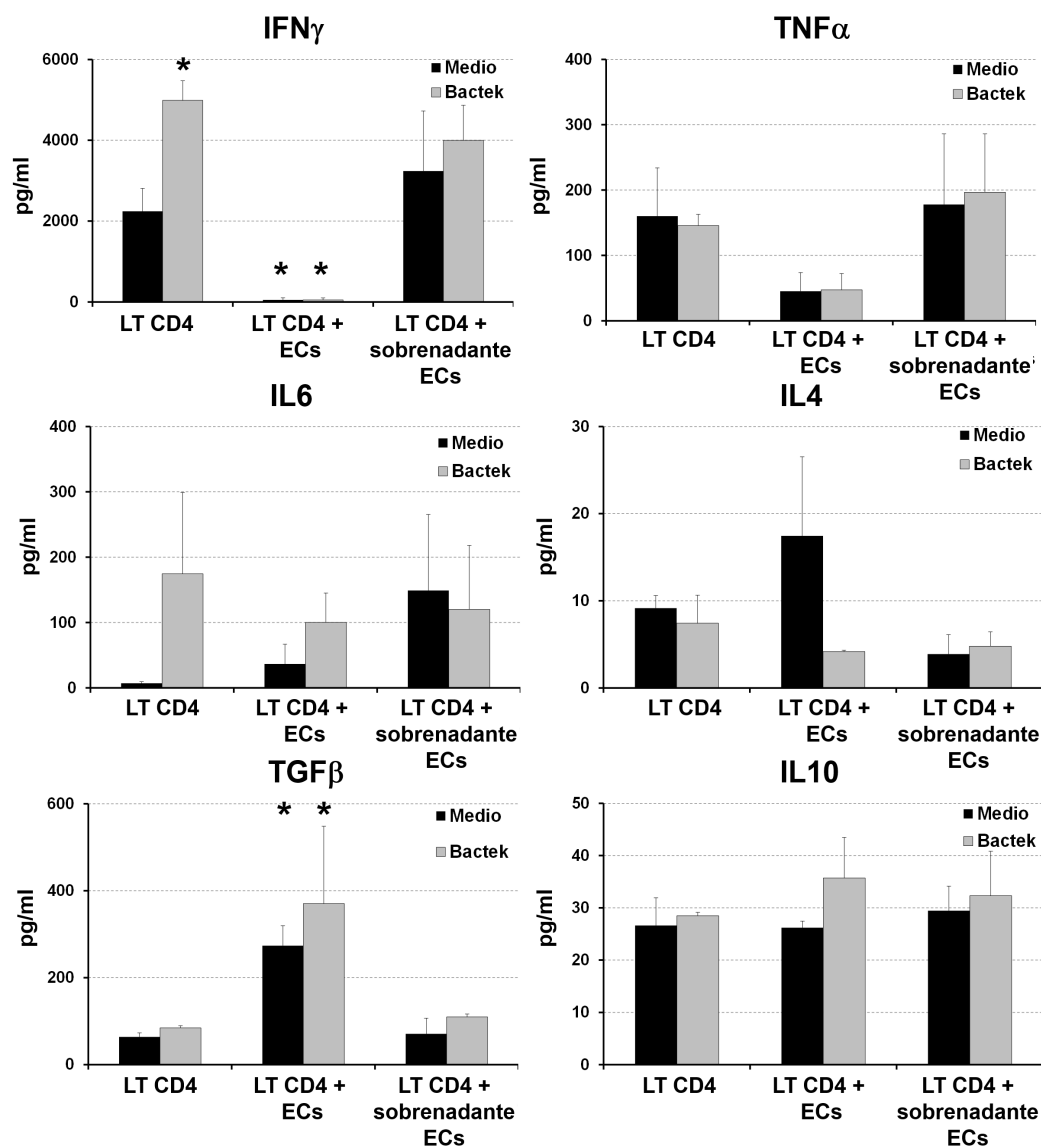


Figura 33. Producción de citoquinas por linfocitos T totales condicionados por ECs primarias. Análisis por ELISA de la secreción de citoquinas indicadas por LT CD4 totales activados con antiCD3 y antiCD28 en las siguientes condiciones: en medio, en cocultivo H413 o con el medio condicionado de H413. Las barras en gris representan el cultivo de células con Bactek®, mientras que en negro representan cultivos de células en medio.

Nuestros resultados indican que LT CD4 totales, son condicionados por las células epiteliales de la mucosa oral sufriendo una fuerte disminución en la secreción de IFN γ y aunque los valores no sean significativos, también se observa una disminución de la producción de TNF α , todo ello independiente del estímulo con Bactek®. Además se observa en el medio de cocultivo un incremento en la liberación TGF β , aunque desconocemos si este aumento debido a la actividad de la célula epitelial, o es una contribución de ambos tipos de células.

4. Estudio del efecto del cocultivo con las células epiteliales en los linfocitos T CD4

Para determinar los mecanismos por los que la célula epitelial modula el perfil de citoquinas que liberan los linfocitos T CD4, utilizamos como modelo el cocultivo de la línea H413 con los linfocitos CD4 totales activados con anti CD3 anti CD28. En este modelo hemos observado que en los cocultivos con linfocitos T CD4 se produce una disminución de las citoquinas IFN γ y TNF α , además del incremento de TGF β . En el contexto de este sistema experimental hemos querido profundizar estudiando el estado de activación del linfocito T, su capacidad de proliferar y su estado de viabilidad

4.1. Análisis de marcadores de activación en linfocitos T CD4

Para analizar el estado de activación del linfocito T en presencia de la célula epitelial., analizamos la expresión de dos marcadores de activación de los linfocitos T, el marcador CD69 de activación temprana y CD25, que forma parte del receptor de IL-2. El diseño experimental utilizado fue similar al esquematizado en figura 30: por una parte cocultivamos linfocitos T CD4 totales activados con antiCD3 y antiCD28 con las células H413 tratados o no Bactek® y en paralelo como control se cultivó en las mismas condiciones los LT CD4 totales activados sin condicionamiento alguno de la célula epitelial. Tras 48 horas de cultivo recogimos las células y analizamos la expresión de CD25 y CD69 por citometría de flujo.

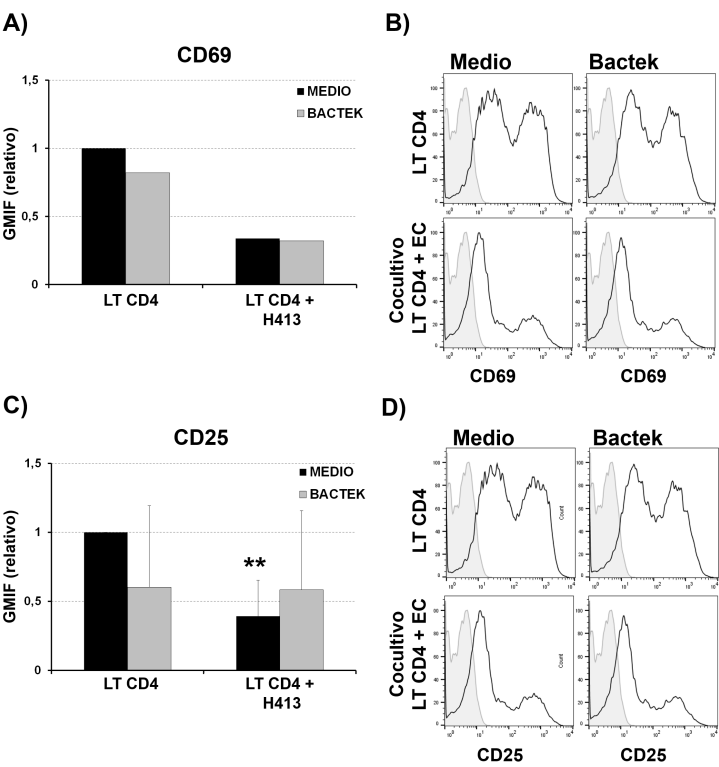


Figura 34. Análisis de expresión de los marcadores de activación en linfocitos T CD4 totales. A) Representación gráfica de la GMIF relativa a los LT CD4 activados con anti CD3y antiCD28 del marcador CD69, en negro las células cultivadas en medio, en gris, estimuladas con Bactek, el primer bloque, LT CD4 y el segundo bloque de barras cocultivos de LT CD4 con ECs. B) Experimento representativo de la expresión de CD69 en cultivos de LT CD4 y cocultivos con ECs. C) Representación gráfica de la GMIF relativa de CD25 D) Experimento representativo de la expresión de CD25.

RESULTADOS

En la figura 34A podemos observar que los LT CD4 totales activados tienen una elevada expresión del marcador CD69, que se mantiene con la estimulación con Bactek®. En los cocultivos con las ECs, sin embargo, se observa una reducción a la mitad de la expresión de este marcador.

Al analizar la expresión de CD25, observamos que los LT CD4 activados también tiene una alta expresión de este marcador, tanto estimulada con Bactek como cultivada con medio. Al poner estos LT CD4 en cultivo con las H413, la expresión del marcador desciende de nuevo a la mitad (Fig. 34B).

Este tipo de efecto ha sido descrito previamente en la literatura en experimentos en los el cocultivos de linfocitos T CD4 con células epiteliales del colon produce un descenso de los niveles de CD25 en el linfocito T, requiriendo para ello el contacto directo de estas células [94]. Dado que los linfocitos T CD4 en presencia de la célula epitelial producen menor cantidad de IFN γ un posible mecanismo por el que la EC podría ejercer este efecto sería disminuir el estado de activación del linfocito T.

4.2. Estudio de la proliferación de LT CD4 en cocultivo con ECs

Nuestros resultados muestran que a pesar de estimular los linfocitos LT CD4 con antiCD3y antiCD28 estos pierden su activación cuando están en contacto directo con las células epiteliales de la mucosa oral. Por lo que nos planteamos estudiar si la proliferación estaba afectada. Para ello marcamos los linfocitos T CD4 con CFSE, molécula fluorescente que se une en la parte interna de la membrana celular. Tras sucesivas divisiones, la célula pierde la mitad de su marcaje, por lo que analizando la fluorescencia de la molécula por citometría podemos determinar el número de divisiones. Los LT CD4 marcados con CFSE fueron activados con anti CD3 y anti CD28 y cocultivados o no con ECs durante 6 días donde se analizó el nivel de CFSE por citometría.

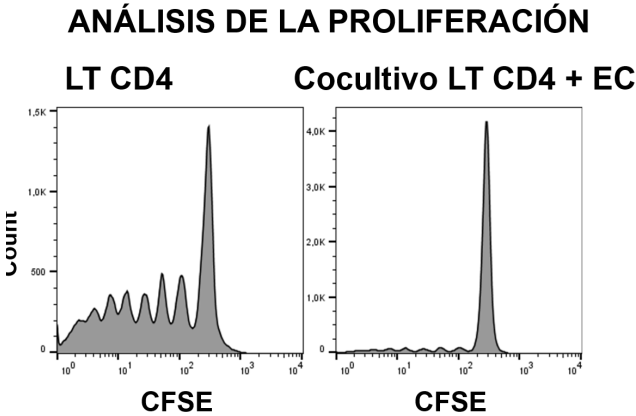


Figura 35. Análisis de la proliferación de los LT CD4 tras 6 días de cultivo. Los linfocitos T CD4 fueron marcados con CFSE y activados con anti CD3 y anti CD28 en presencia o ausencia de células epiteliales.

En la figura 35 se observa la proliferación de los LT CD4 activados, mostrando que las células se han dividido 6-7 veces en los 6 días de cultivo. En el cocultivo de LT CD4 y célula epitelial se observa el mismo número de divisiones, pero en esta ocasión, son pocas las células capaces de proliferar. Estos resultados están en total acuerdo con los observados en el apartado anterior, hay una menor expresión de marcadores de activación, especialmente de CD25, molécula implicada en la formación del receptor de IL2, interleucina inductora de proliferación.

4.3. Análisis de la viabilidad de LT CD4 en cocultivo

Al detectar que disminuye la proliferación celular, así como la activación de los LT CD4 activados cuando están en cocultivo, quisimos determinar si la viabilidad de los LT CD4 estaba comprometida en presencia de la célula epitelial. Para ello utilizamos el método de tinción con Anexina V y 7AAD. La AnexinaV es una proteína recombinante que se une específicamente a residuos de fosfatidilserina, los cuales se encuentran expuestos en la cara externa de la membrana plasmática cuando la célula entra en apoptosis. El 7-AAD es un agente fluorescente intercalante del ADN incapaz de penetrar células intactas pero que une el ADN de células necróticas y es usado como marcador de viabilidad.

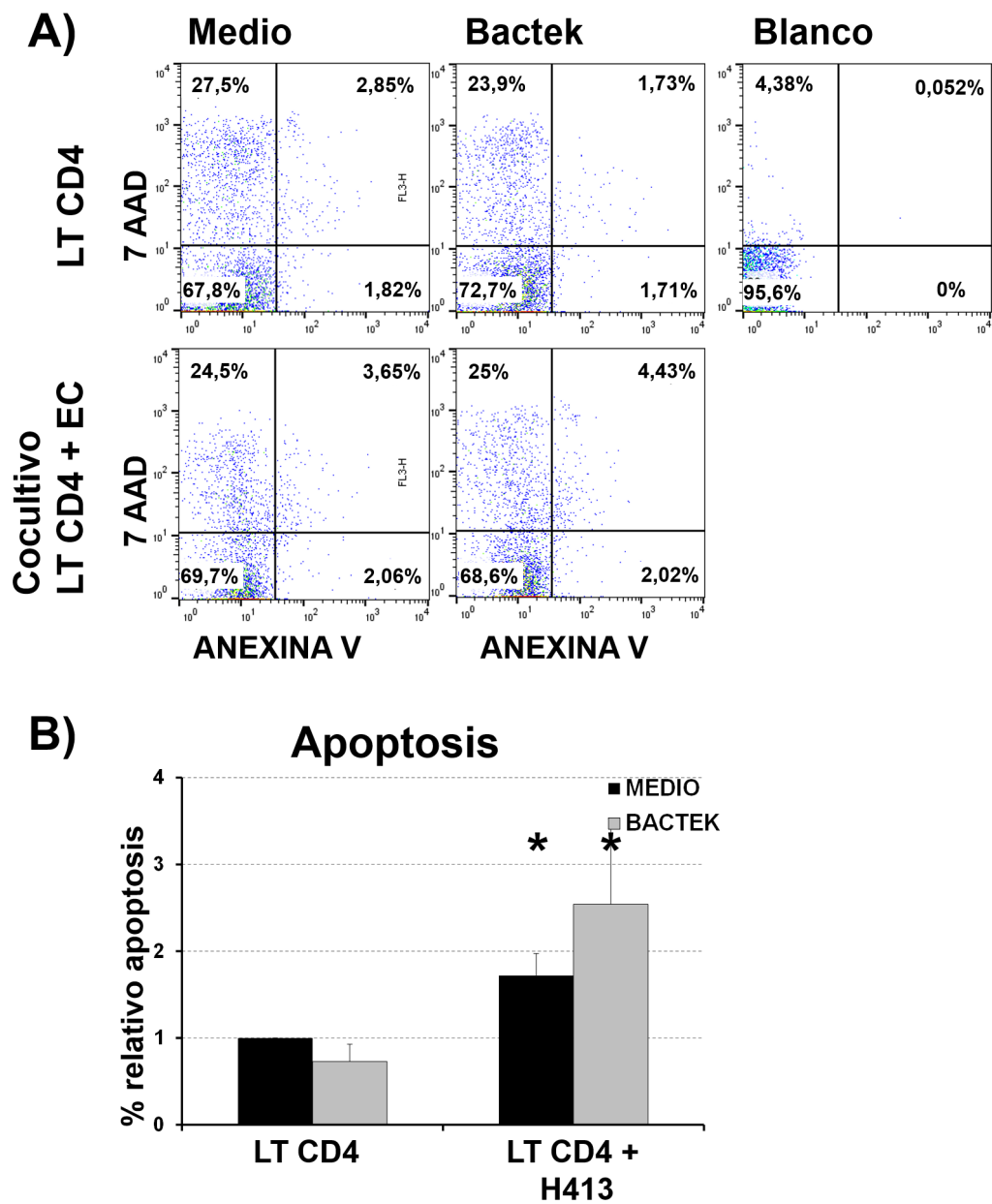


Figura 36. Análisis de la viabilidad celular y apoptosis de LT CD4 en cocultivo con ECs de la *mu-cosa oral*. A) Experimento ejemplo del estudio de la apoptosis, en ordenadas el marcaje con 7-AAD y en abscisas el marcaje con Anexina V . B) Representación gráfica del porcentaje relativo de células en apoptosis

RESULTADOS

Repitiendo el mismo diseño experimental, realizamos el cultivo de LT CD4 activados con antiCD3 y antiCD28 en presencia o ausencia de las ECs de la mucosa oral estimulados con o sin Bactek®. Pasadas las 48 horas de cultivo recogimos las células y las teñimos con Anexina V y 7-AAD. Los resultados muestran que en los LT CD4 cultivados en medio existe un 3% de células que entran en apoptosis (7-AAD +, AnexinaV +), habiendo un 27% de células muertas (7-AAD+), y un 70% de LT CD4 vivas (Fig. 36), no habiendo diferencias al tratarlas con Bactek®. Los LT CD4 en presencia de las ECs, presentan el doble de sus células en apoptosis (4%), en cuanto al número de células muertas, es del 25%, mismo valor que en los LT CD4 sin la presencia de la EC. A pesar de que los resultados nos muestren que hay un mayor porcentaje de células en apoptosis, el número de células apoptóticas es muy pequeño (4%), y el número de células muertas se mantiene, por lo que parece que el epitelio no está induciendo muerte en los linfocitos T CD4.

4.4. Estudio de la supresión de PD-1 LT CD4

Con los datos obtenidos hasta el momento, una reducción de la activación determinada por la expresión de CD25, una menor proliferación sin detectar alteraciones en muerte celular, que explicasen los cambios en el perfil de citoquinas, decidimos estudiar si los linfocitos T CD4 expresaban el marcador de muerte programada 1 o PD1. Esta proteína tiene un papel importante en el mantenimiento de tolerancia periférica, se expresa en linfocitos T activados a través del TCR o a través de receptores de citoquinas. Su expresión es inducida factores de transcripción como FOXO1, Notch y IRF9 e inhibida por T-bet. Regula negativamente la actividad del linfocito T inhibiendo la vía PI3K-Akt de supervivencia y suprimiendo la liberación de IL-2 [130]. En linfocitos T promueve la apoptosis en linfocitos antígeno específicos mientras que en linfocitos T reguladores reduce la apoptosis. Dada la importancia de este marcador en tolerancia quisimos cuantificar la expresión de esta proteína, y para ello cultivamos LT CD4 activados con antiCD3 y antiCD28 en presencia o ausencia de las ECs de la mucosa oral, estimulados o no con Bactek®. Tras 48 horas de incubación, analizamos la expresión de PD1 por citometría. En los LT CD4 cultivados sin la presencia de la EC observamos una elevada expresión del marcador PD1 (Fig 37), no observándose diferencias significativas al tratarlas con Bactek. Los LT CD4 en presencia con las ECs se expresan menos PD1.

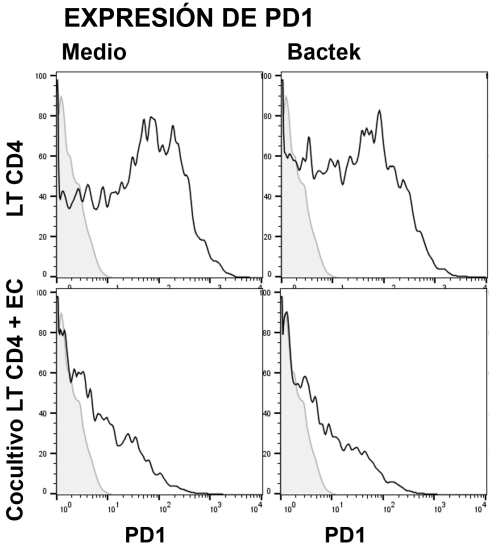


Figura 37. Expresión de PD1 en los linfocitos T CD4 Experimento representativo de la expresión de PD1 en LT CD4 y cocultivos con ECs por citometría de flujo.

4.5. Capacidad de estimulación de los linfocitos tras el cultivo

Los datos analizados indican que LT CD4 en cocultivo con las ECs de la mucosa oral no tiene comprometida su viabilidad ni entran en apoptosis, no proliferan aunque pierden su activación. A continuación nos planteamos estudiar si tras retirarlos del cocultivo con las células epiteliales y reactivarlos con antiCD3 y antiCD28 son capaces de secretar de nuevo citoquinas a niveles similares a los detectados previos al cocultivo. Realizamos cultivos de linfocitos T CD4 activados con anti CD3 y anti CD28 en presencia o ausencia con las células H413 tratados con o sin Bactek® durante 48 horas. A continuación, aislamos los LT CD4, y los reactivamos con antiCD3 y antiCD28 y los tratamos con o sin Bactek®. Tras otras 48 horas de cultivo se midieron por ELISA las citoquinas IFN γ , TNF α y TGF β .

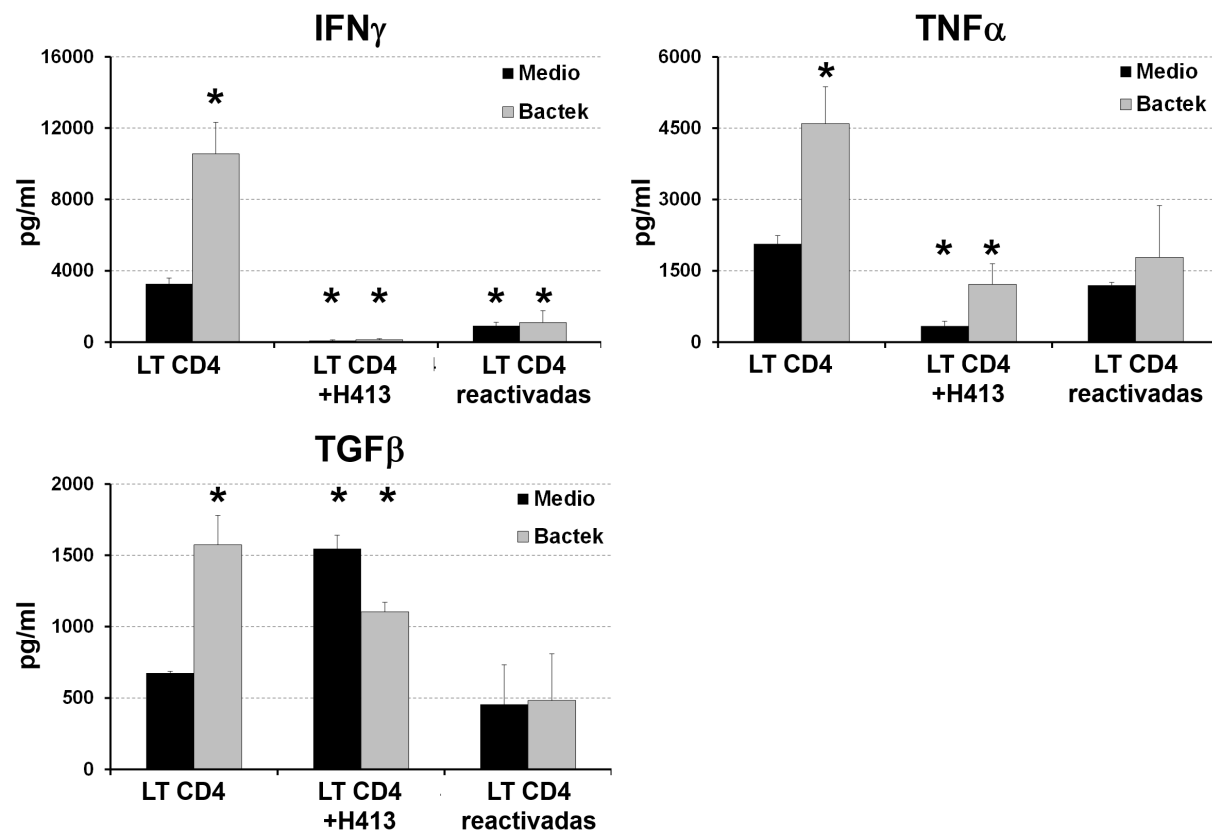


Figura 38. Producción de citoquinas por linfocitos T CD4 totales condicionados por H413. Análisis por ELISA de la secreción de citoquinas indicadas por LT CD4 totales activados con antiCD3 y antiCD28 en las siguientes condiciones: en medio, en cocultivo H413 o tras aislamiento los LT CD4 del cocultivo. Las barras en gris representan el cultivo de células con Bactek®, mientras que en negro representan cultivos de células en medio

Los LT CD4 totales producen altas cantidades de IFN γ (10000 pg/ml) y TNF α (1500 pg/ml) y cantidades moderadas de TGF β (600 pg/ml), al ser estimulados con Bactek® incrementan la secreción de al menos el doble de cada una de las citoquinas (Fig. 38). En el caso de los sobrenadantes recogidos tras el cocultivo de ECs y LT CD4, se observa un descenso de la producción de IFN γ y TNF α y un incremento de TGF β . Al aislar los LT CD4 del cocultivo con las ECs, ponerlos de nuevo en cultivo en ausencia de la EC y reactivarlos, se detecta: una pequeña producción de IFN γ , mucho menor a la producida por el linfocito T en ausencia de EC. Los niveles de TNF α y TGF β se reestablecen, aunque no son capaces de incrementar al estimular de nuevo con Bactek®. En definitiva los datos indican que los linfocitos TCD4 tras la activación en presencia de células epiteliales son parcialmente refractarios a nuevas activaciones y a la producción de IFN γ .

RESULTADOS

4.6. Estudio de la respuesta de los LT CD4 en cocultivo tras el bloqueo de TGFβ

Puesto que TGFβ es una citoquina central con un papel importante en la inducción de tolerancia y en todos nuestros experimentos de cocultivo se encuentra de forma constante incrementada, decidimos determinar si esta citoquina podría jugar un papel en la supresión de la producción de IFNγ en el cocultivo del LT CD4 y la célula epitelial.

La estrategia llevada a cabo fue bloquear el TGFβ soluble con anticuerpo anti-TGFβ y comprobar si los niveles de citoquinas IFNγ y TNFα en el medio se reestablecían. Para ello cultivamos las ECs durante 48 horas, pasado ese tiempo añadimos al cultivo distintas cantidades de anti-TGFβ: 20 ng/ml, 300 ng/ml y 2.5 μg/ml durante 4 horas para asegurarnos que el TGFβ soluble quedaba bloqueado y añadimos LT CD4 totales activadas con antiCD3 y antiCD28. Pasadas otras 48 horas, se recogieron los sobrenadantes y se midieron por ELISA las concentraciones liberadas de IFNγ y TNFα.

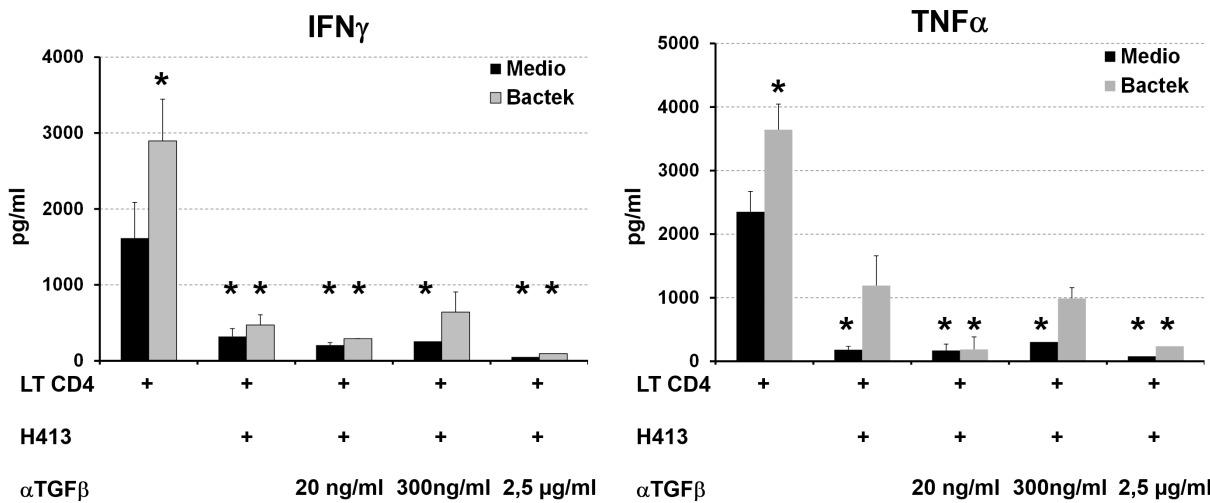


Figura 39. Producción de citoquinas por linfocitos T CD4 totales condicionados por H413. Análisis por ELISA de la secreción de citoquinas indicadas por LT CD4 totales activados con antiCD3 y antiCD28 en cultivo con las células H413 y con distintas concentraciones de anti-TGFβ.

Como en experimentos anteriores, los LT CD4 activados producen grandes cantidades de IFNγ y TNFα que son incrementados al estimularlos con Bactek® (Fig. 39). En el cocultivo de LT CD4 con las ECs H413 de nuevo observamos la disminución de los niveles de IFNγ y TNFα, pero al bloquear el TGFβ en el cocultivo no se consigue restablecer la producción de estas citoquinas producidas en el cultivo original. Los resultados obtenidos parecen indicar que el TGFβ no es responsable de la disminución de las citoquinas proinflamatorias en el medio. Esto concuerda con el hecho de que los sobrenadantes de los EC no tienen el mismo efecto que el contacto directo célula EC- LT.

5. Estudio del efecto de los linfocitos T CD4 sobre las células epiteliales

Hasta ahora hemos abordado el estudio del efecto que las células epiteliales de la mucosa oral ejercen sobre los linfocitos T CD4, pero también quisimos estudiar si la sopa de citoquinas liberadas por el linfocito T podría ejercer un efecto sobre las células epiteliales.

5.1. Estudio del efecto del medio condicionado por los LT CD4 sobre las ECs de la mucosa oral

Las células epiteliales pueden expresar receptores de IFN γ y TNF α por lo que comprobamos si nuestras células epiteliales de la mucosa oral los expresan. Por lo que estudiamos si las células epiteliales H413 son capaces de unir el IFN γ y el TNF α presente en el medio y así modificar su estado de activación.

Para abordar el efecto de los LT CD4 sobre las ECs, primero cultivamos LT CD4 activados con anti-CD3 y anti-CD28 durante 24 horas para recoger el sobrenadante condicionado (sobrenadante inicial). Con este medio condicionado cultivamos las ECs durante 24 y 48 horas. Como referencia, cultivamos los LT CD4 sin presencia de la ECs. En los sobrenadantes medimos por ELISA: IFN γ , TNF α y TGF β .

El sobrenadante de las LT CD4 (inicial) contiene altos niveles de IFN γ (1000 pg/ml), cantidades moderadas de TNF α (800 pg/ml) y baja cantidad de TGF β (50 pg/ml) (Fig.40). En los cultivos de ECs con medio condicionado por los LT CD4, observamos que los niveles de IFN γ TNF α disminuyen a la mitad a las 24 horas y 48 horas de cultivo (Fig 40), sin embargo, se observa un incremento de TGF β , a las 24 horas y un ligero incremento más a las 48 horas.

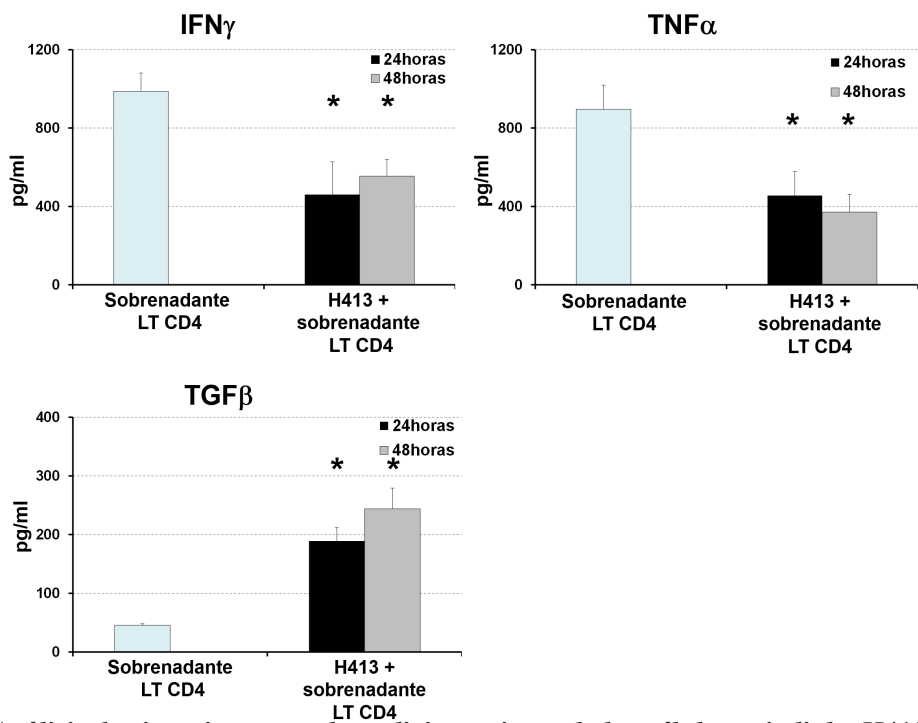


Figura 40. *Análisis de citoquinas tras el condicionamiento de las células epiteliales H413 con medio de LT CD4 activados. Análisis por ELISA de la secreción de citoquinas indicadas por LT CD4 totales activados con antiCD3•y antiCD28 y en cultivo de H413 con el sobrenadante inicial a las 24 horas y 48 horas.*

RESULTADOS

Los resultados muestran que la célula epitelial de la mucosa oral utiliza y consume parte de las citoquinas IFN γ y TNF α producidas por los LT CD4. Esto podría explicar la bajada de estas citoquinas en el cocultivo, no obstante los niveles de citoquinas gastados por la célula epitelial representan solo el 50% de los producidos por el linfocito T y no explicarían la fuerte bajada de IFN γ , a niveles casi indetectables en los cocultivos. Por otra parte observamos un aumento en la cantidad de TGF β producido principalmente por la ECs, que serían las principales contribuyentes a la producción de esta citoquina en el cocultivo.

5.2 Estudio de la expresión de marcadores de superficie en ECs condicionadas por LT CD4

Tras comprobar que algunas citoquinas del sobrenadante son consumidas por las ECs, quisimos comprobar si estas generan una respuesta en ellas. Para ello nos planteamos estudiar fenotípicamente las ECs que habían sido cultivadas con medios procedentes de LT CD4 activados, analizando por citometría de flujo la expresión de los marcadores de superficie: MHC-I, CD40 y HLA-DR. Para ello cultivamos LT CD4 activadas con antiCD3 y anti CD28 durante 24 horas y utilizamos este sobrenadante como medio condicionado de cultivo de las células epiteliales de la mucosa oral H413. Por otra parte realizamos el cultivo de ECs en presencia o ausencia de los LT CD4.

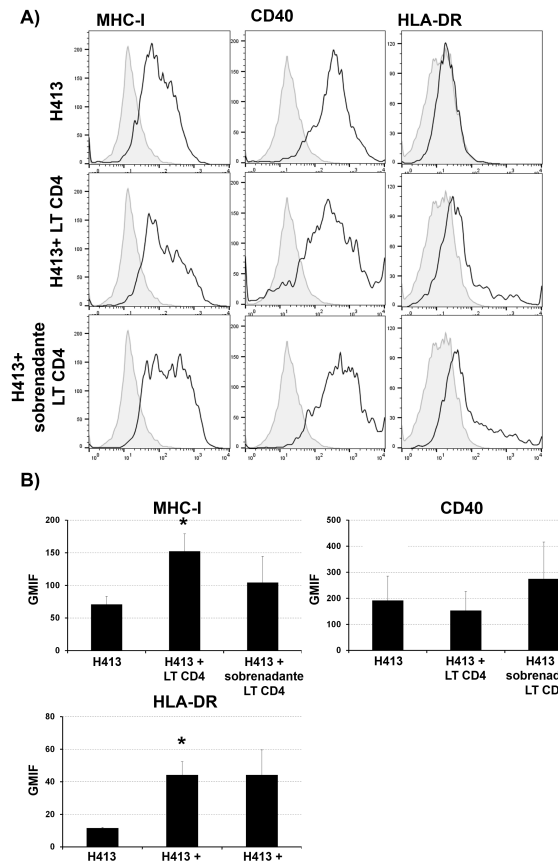


Figura 41. Análisis de expresión de los marcadores en ECs de la mucosa oral condicionadas por linfocitos T activados. A) Representación gráfica de la GMIF para los marcadores MHC-I, CD40 y HLA-DR. B) Experimento representativo de la expresión de los marcadores estudiados.

Las H413 expresan de manera constitutiva MHC-I y CD40 (Fig. 41). En cocultivo con linfocitos T incrementan significativamente los niveles de MHC-I y HLA-DR, mientras que no se observaron variación en los niveles de CD40. Las ECs condicionadas con sobrenadantes de los LT CD4, muestran el mismo efecto que en presencia del linfocito T CD4, incrementando los niveles de MHC-I, CD40 y HLA-DR. Por tanto la presencia del linfocito T activado o los factores liberados al medio por este modifican la expresión de moléculas presentadoras de antígeno y del marcador de cooperación CD40 en la célula epitelial de la mucosa oral

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. Las células epiteliales de la mucosa oral responden a estímulos bacterianos

La inmunidad de la mucosa oral es la encargada de neutralizar antígenos extraños, evitar infecciones y colonizaciones de microorganismos patogénicos y para ello ha desarrollado mecanismos de defensa de tipo inflamatorio. Además la mucosa oral ha de tomar continuamente decisiones sobre el tipo de respuesta inmunológica que debe desarrollar cuando entra en contacto con microorganismos comensales y alimentos no patogénicos. Para ello dispone de mecanismos de inducción de tolerancia que junto a las repuestas inflamatorias son desencadenados con el fin de mantener la defensa y homeostasis del tejido.

Las células epiteliales de la mucosa oral son las células mayoritarias a las que se le ha atribuido un papel de barrera física, pero también forman parte de la respuesta inmune, ya que son las primeras células que entran en contacto con los antígenos externos y pueden comunicar su presencia al medio interno a través de señales, como citoquinas o mediante la expresión de marcadores de superficie. Su función es por tanto la de actuar como primera defensa con un papel importante en la inmunidad innata.

Nuestros estudios muestran que las células epiteliales de la mucosa oral son capaces de responder a estímulos bacterianos (Bactek®) y a IFN γ expresando en su superficie moléculas presentadoras de antígeno MHC-I, MHC-II y bajos niveles de moléculas coestimuladoras CD86, CD80, CD40 y CD83, aunque de manera basal solo hemos podido encontrar una clara expresión de CD40 (Fig 42). Este fenotipo está en consonancia con estudios previos, donde células epiteliales de la mucosa oral expuestas a bacterias vivas incrementan la expresión de MHC-II, CD80 y CD86 [11]. Otros estudios muestran que las células epiteliales de la epidermis son capaces de responder a estímulos inflamatorios como el IFN γ incrementando los niveles de HLA-DR y MHC-I en superficie [56], además este tipo epitelial también es capaz de expresar CD80 tras la exposición a alérgenos y mediadores inflamatorios [131, 132]. Las células epiteliales del colon en ratón muestran un incremento de la expresión de MHC-II, al igual que en células epiteliales del intestino de ratón cuando son estimulados por IFN γ . [54, 133]. Otros estudios describen inducción en la expresión de MHC-II, CD80 y CD40 bajo la estimulación bacteriana no solo en células epiteliales de intestino [134], sino también en células epiteliales de las vías aéreas [8, 28, 95, 135, 136]. Es remarcable que a pesar de que la expresión de estos marcadores es mínima en epitelios no activados e inducida bajo estímulo, la expresión de CD40 es constitutiva en varios epitelios como el de las vías aéreas, del timo, intestino, córnea e hígado [135]. Se ha propuesto que esta molécula estimula la expresión de los mediadores inflamatorios IL8, RANTES, MCP-1 o ICAM-1 [137].

Estos datos sugieren que las células epiteliales de la mucosa oral tienen la maquinaria para actuar como APC no profesionales, aunque debido a la baja expresión de las moléculas coestimuladoras y este proceso no sería el mismo que el de las APCs profesionales. En relación con esto, estudios anteriores sugirieron que a pesar de que las células epiteliales del intestino de roedor expresan MHC-II y MHC-I además de CD58 y gp180, el procesamiento y presentación difiere al de una APC. No está claro el tipo de respuesta que induciría la presentación de antígeno por parte de la célula epitelial en linfocitos T, podría inducir homeostasis, tolerancia, inflamación, citolisis o actividad supresora [138-141].

DISCUSIÓN

Junto a la expresión de marcadores de maduración de APCs hemos estudiado la producción de citoquinas al estimular las células epiteliales de la mucosa oral con Bactek®. De manera constitutiva, las líneas celulares H413 y TR134 liberan altas concentraciones de IL6 e IL8 y esta secreción se ve incrementada con la estimulación con Bactek® (Fig.42). Hay una gran cantidad de líneas epiteliales de distintos orígenes que secretan de manera constitutiva IL6 [142], esta citoquina tiene varias funciones, es un regulador de la respuesta inmune y de la inflamación, también está involucrada en el proceso de proliferación celular, la supervivencia y por tanto se ha involucrado en tumorigénesis de las células epiteliales [143, 144]. La secreción de IL6 además es incrementada ante la presencia de bacterias, así líneas celulares epiteliales procedentes del tracto urinario y del intestino responden positivamente a la estimulación con bacterias gram-negativas liberando esta citoquina [145]. Esta producción de IL6 también puede verse incrementada en células del epitelio intestinal (Caco-2) al estimularse con mediadores pro-inflamatorios como IL1 β o TNF α [146]. Estudios realizados en células epiteliales de la mucosa oral han encontrado inducida la secreción de IL6 e IL8 al ser estimuladas con un modelo de infección de periodontitis [9]. En células epiteliales del tracto respiratorio también se ha observado incremento de IL6 e IL8 en respuesta a un estímulo catiónico, otorgándoles un papel iniciador en la inflamación [147]. Por su parte IL8 es un factor quimiotáctico de neutrófilos, puede actuar también como elemento clave para evitar la invasión de bacterias y mantener la adherencia, como describen en los trabajos de adherencia de infecciones en las encía [148] y la infección de *Helicobacter pylori* en las células epiteliales del estómago [149, 150].

Por tanto la expresión constitutiva en las líneas epiteliales de IL6 e IL8 puede ser debida a que actúan como factores necesarios para la supervivencia de la célula epitelial e incrementan en respuesta a la vacuna bacteriana, probablemente para iniciar un proceso de inflamación y evitar así la colonización generalizada bacteriana.

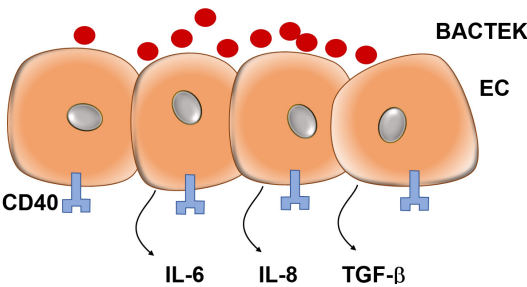


Figura 42. Respuesta de las células epiteliales de la mucosa oral a Bactek®. Las ECs de la mucosa oral expresan constitutivamente CD40, IL6, IL8 y TGF β al ser estimuladas con Bactek® la expresión de CD40 apenas varía, incrementando la secreción de IL6 e IL8

En cuanto a las células epiteliales primarias de la mucosa oral, nuestros resultados indican que no liberan cantidades significativas de las citoquinas y quimioquinas estudiadas, excepto TGF β que se secreta en cantidades moderadas de manera constitutiva y cuya producción se ve disminuida al estimular las células epiteliales con Bactek®. Esta secreción constitutiva de TGF β podría tener un papel en la función en el mantenimiento de la homeostasis de la mucosa oral y tolerancia frente a la gran cantidad de microorganismos con los que entrarían en contacto. En este sentido se ha descrito que el mecanismo responsable de la homeostasis en la mucosa pulmonar depende de la secreción de TGF β , cuya función principal es inducir la tolerancia [89, 151]. TGF β tienen un papel dual, por una parte es un agente antiinflamatorio, promoviendo la transcripción de Foxp3 facilitando la generación de linfocitos T reguladores

e inhibiendo a los LT Th1 y Th2 inhibiendo la producción de T-bet y GATA3, respectivamente. Por otra parte, puede tener un papel proinflamatorio promoviendo la diferenciación de LT Th17 si además hay presencia de IL6 en el medio y la diferenciación a LT Th9 si hay IL4 [152, 153]. Estudios previos han comprobado que el TGF β mantiene la homeostasis en las mucosas, ya que la falta de este induce procesos de inflamación [154].

2. Las células dendríticas condicionadas por las células epiteliales de la mucosa oral maduran parcialmente siendo incapaces de responder a estímulos

El sistema inmune de la mucosa oral tiene un elaborado mecanismo para mantener la homeostasis inmunológica, siendo las células dendríticas de la mucosa oral las principales encargadas de inducir la inmunidad o la tolerancia.[2]

Nuestros resultados muestran que las células dendríticas derivadas de monocitos son capaces de madurar en presencia de Bactek®, incrementando todos los marcadores de maduración analizados: CD80, CD86, CD40, HLA-DR y MHC-I (Fig. 43A) siendo los niveles de activación comparables a los que producen con el estímulo de LPS. Esta maduración producida por la vacuna bacteriana es explicable ya que aunque no se trate de bacterias vivas, éstas siguen manteniendo la integridad de su pared bacteriana [155],

Nuestros resultados muestran que el contacto directo de la célula epitelial con la célula dendrítica, es capaz de madurar parcialmente a la célula dendrítica, incrementando al doble la expresión basal de CD86, CD40 y HLA-DR, aunque no llega a adquirir los niveles de maduración (Fig. 43B y C). A pesar de esta maduración parcial en ausencia de estímulo, la célula dendrítica no consigue madurar correctamente cuando es tratada con Bactek®, manteniendo niveles de marcadores de maduración similares a cuando no es estimulada, siempre en presencia de la célula epitelial.

El hecho de que la célula epitelial incremente la expresión basal de marcadores de maduración en la célula dendrítica ha sido descrito en otros tipos celulares. Estudios anteriores describieron que el contacto de las células epiteliales de las vías aéreas eran capaces de incrementar los niveles de CD80 en las células dendríticas cuando estaban en contacto directo [156, 157]. En estudios con células epiteliales renales tubulares observaron que el contacto directo con DCs derivadas de monocitos incrementan los niveles de expresión de CD80, CD86, HLA-DR y CD40, siendo los niveles de expresión inferiores a las DCs tratadas con LPS [158], por lo que el contacto con las células epiteliales está suprimiendo la correcta maduración de las DCs. Lo mismo observaron en células epiteliales pigmentarias de la retina, donde estaba alterada la expresión de CD80, CD86 y HLA-DR en las células dendríticas maduras al entrar en contacto estas células epiteliales [159]. En el intestino, el contacto de célula epitelial y célula dendrítica induce la expresión de CD86 y CD40, siendo responsable de un estado tolerogénico [160-162].

Por tanto la suma de estas evidencias sugiere que la interacción directa entre célula dendrítica y célula epitelial de la mucosa oral estimula a la célula dendrítica para que madure parcialmente. Esta baja expresión de marcadores de maduración por la célula dendrítica es considerada como responsable de un estado tolerogénico, siendo incapaz de responder correctamente a estímulos y de inducir la activación de los linfocitos T.

DISCUSIÓN

En cuanto a las citoquinas producidas, las células dendríticas estimuladas con Bactek® observamos que las células dendríticas produjeron altos niveles de $\text{TNF}\alpha$, IL12, IL6, e IL10 respecto a las células dendríticas sin estimular (Fig.43A). Son numerosos los estudios de estimulación de células dendríticas con bacterias, donde se describe el incremento en la liberación de citoquinas proinflamatorias, por ejemplo, la estimulación de las células dendríticas con *Salmonella* induce en éstas la secreción de grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias como IL8, IL1 β , $\text{TNF}\alpha$, e IL12, responsables de la inducción de un proceso de inflamación y la diferenciación de linfocitos T CD4 hacia Th1 [13, 160]. En nuestros ensayos el tratamiento con Bactek® induce en la célula dendrítica la expresión de IL-10, citoquina relacionada con la tolerancia. La liberación de esta citoquina por las células dendríticas no es inusual ya que algunos estudios han encontrado que las células dendríticas al ser estimuladas con otros inmunomoduladores bacterianos no solo incrementan la secreción de citoquinas proinflamatorias, sino la secreción de IL10 [155]. Por tanto es posible que la presencia de bacterias no vivas o latentes induzca tanto citoquinas proinflamatorias, como IL10.

En cambio, en contacto directo de células dendríticas con células epiteliales de la mucosa oral o con medio condicionado por las células epiteliales se detectaron IL12, IL6, IL10 y $\text{TGF}\beta$, y al estimular los cultivos con Bactek® no obtuvimos diferencias en el patrón de secreción respecto a los no estimulados (Fig. 43B).

Estudios de otros grupos también han detectado la producción de niveles elevados de IL10 en el medio en cocultivos de células epiteliales del intestino junto con células dendríticas [163]. También en cocultivos de células epiteliales intestinales y células dendríticas, se observó una producción constitutiva de $\text{TGF}\beta$, que incrementaba al estar ambas células en contacto directo y que no se inducía por estímulos bacterianos, en contraposición con la secreción de IL6, IL12 e IL10 que se veía incrementada por la estimulación de los cocultivos con bacterias [162]. Aunque es en principio difícil de explicar, esta discrepancia de sus resultados con los nuestros podría ser debida a que en dicho estudio se trata al cocultivo con bacterias vivas. En el epitelio pulmonar en estudios de respuestas a agentes como el polen ocurre un fenómeno parecido al observado en nuestros resultados; el contacto con el epitelio incrementa los niveles de IL12 e IL10 producidos por la célula dendrítica, pero estos no se ven alterados al ser estimulados con polen [157].

Nuestros datos junto con los descritos anteriormente, sugieren que las células dendríticas son condicionadas por las células epiteliales para inhibir una respuesta inflamatoria, ya que no son capaces de responder correctamente a estímulos, cuando están en contacto directo la célula epitelial y la célula dendrítica. La presencia de IL10 y $\text{TGF}\beta$ en los cocultivos además, sugiere que podrían estar polarizándose a células dendríticas tolerogénicas.

Además, en nuestros cocultivos de células dendríticas y células epiteliales orales primarias detectamos elevados niveles de IL1 β , $\text{TNF}\alpha$ e IL10 inducidos por el contacto directo, independientemente de la presencia del estímulo (Fig.43C). Estudios en el epitelio de las vías aéreas se ha descrito que la secreción de IL1 β incrementa la secreción de $\text{TNF}\alpha$ induciendo un proceso inflamatorio incrementando en las células epiteliales la expresión del receptor de $\text{TNF}\alpha$ [164]

Esto podría indicar que las células primarias de la mucosa oral tienen una mayor capacidad para inducir en la célula dendrítica tanto una respuesta inflamatoria como para inhibirla.

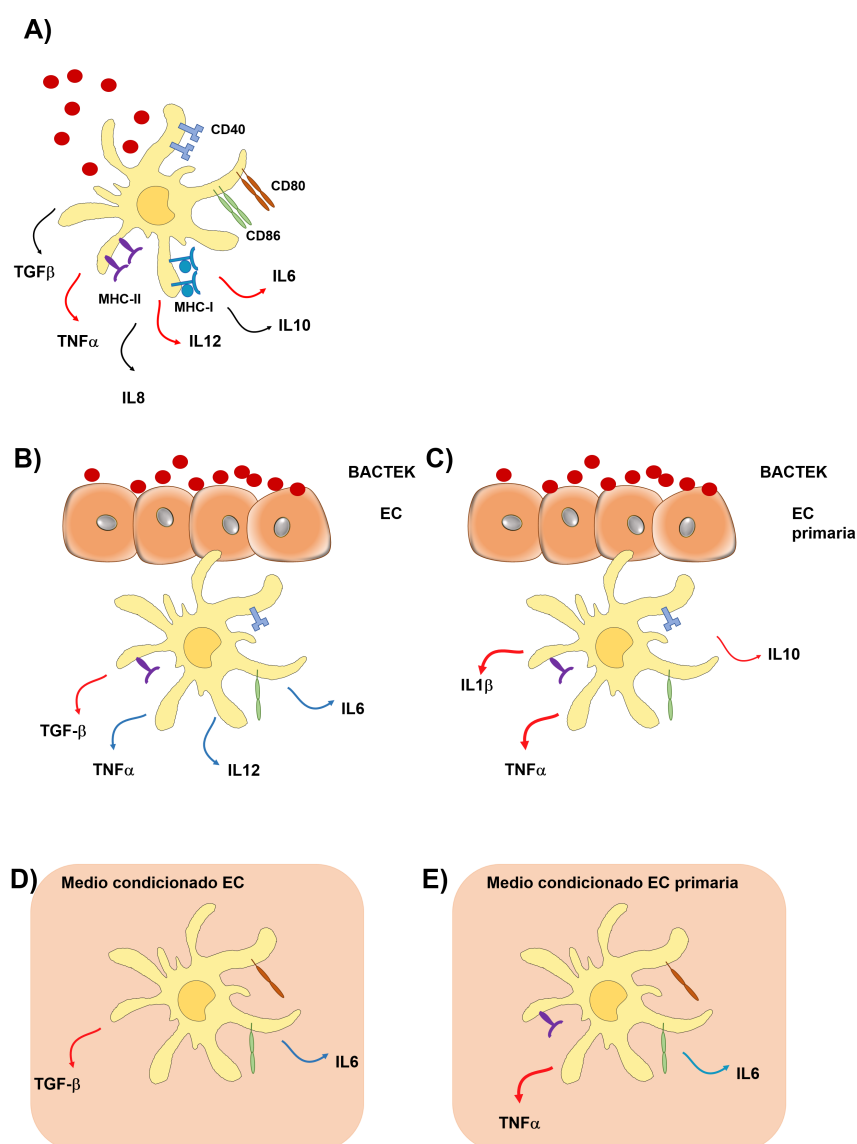


Figura 43. Respuesta de DCs a Bactek® en ausencia o presencia de células epiteliales. A) Respuesta de las células dendríticas al Bactek® caracterizada por una alta expresión de marcadores de maduración y presentación antigénica y la elevada producción de TNF α , IL12 e IL6. B) Respuesta del cocultivo de células dendríticas con células epiteliales y Bactek®, disminuyen CD40, CD86 y MHC-II, disminuye la secreción de IL12, IL6 y TNF α , incrementándose la de TGF β . C) Respuesta de DC cultivada con medio condicionado por las EC. D) Respuesta de DC cultivada con medio condicionado por las EC primarias.

DISCUSIÓN

3. El cocultivo de células dendrítica y células epiteliales modifica el estado de activación y diferenciación de linfocitos T CD4 naïve

Nuestros resultados sugieren que en cocultivo con las células epiteliales, las células dendríticas podrían adquirir un estado tolerogénico caracterizado por una deficiente expresión de marcadores de maduración, el incremento en la liberación de IL10 y TGF β . Este perfil tolerogénico se caracteriza por inducir inhibición de respuestas Th1/Th2 y por la inducción en el linfocito T de un fenotipo regulador.

Nuestros resultados muestran que al cultivar linfocitos T CD4 naïve con el cocultivo de las líneas epiteliales TR146 y H413 y las células dendríticas, hay una disminución de la activación en el linfocito T, además de una supresión de la diferenciación hacia Th1, Th2, ya que no encontramos secreción de IFN γ o IL4. La expresión de Foxp3 se encuentra ligeramente aumentada, sin embargo la ausencia de expresión del marcador CD25 nos impide concluir que aumente la población de linfocitos T reguladores (Fig. 44B).

En cambio, las células epiteliales primarias en cocultivo con las células dendríticas no inhibe la activación de los linfocito T determinada por la expresión de CD25, y un 19 % de la población se diferencia a Treg (Fig.44C). No obstante se produce un bloqueo de la diferenciación a Th1 y Th2, ya que no somos capaces de detectar IFN γ o IL4, respectivamente. Estos datos sugieren que en cierta medida las células epiteliales inducen un perfil tolerogénico en la célula dendrítica que conduce a una inhibición de las respuestas Th1 y a un incremento de los linfocitos T reguladores

En otros estudios realizados con células epiteliales de la mucosa de las vías aérea, observaron también una disminución del 50% de la activación de los linfocitos, en cuanto a la diferenciación de los linfocitos T CD4 observaron que en presencia de alérgenos se iniciaba una respuesta Th2 con secreción de IL4 [156, 157]. En células epiteliales de las vías aéreas también se observó que solo cuando la célula epitelial estaba en contacto con la célula dendrítica, se disminuía la activación de las células T y además se inhibía la producción de las citoquinas IFN γ , IL5, IL17 y TNF α . Los autores demostraron que este efecto fue debido a la activación de varios mecanismos: por una parte a que ciertas células se diferenciaban a Treg, en parte a la producción de TGF β soluble y posiblemente el mayor efecto fue mediado por las células epiteliales proporcionando a través de su membrana una inhibición dependiente de contacto [165]. Otros estudios relacionados con células epiteliales del colon también describen la inhibición de la activación de los linfocitos T en presencia de células dendríticas y células epiteliales, con un bloqueo en la respuesta Th1, aunque con una inducción de la respuesta Th2 y de Treg [13, 15, 161].

Nuestros datos difieren de los anteriores, en que en el cocultivo con células primarias de la mucosa oral la activación no es inhibida aunque la diferenciación a Th1 si es suprimida. Esto puede ser debido a la presencia de IL10 que se produce en el cocultivo de las células dendríticas con las células epiteliales primarias. La IL10 es liberada principalmente por macrófagos, DC y linfocitos T, sin embargo también puede ser liberada por células epiteliales con expresión dependiente de tejido. Mientras que EC de las vías aéreas no expresan IL10 [98, 166], esta es producida por las células epiteliales del intestino a muy bajo nivel regulando la integridad del tejido. En nuestro estudios en el epitelio oral la liberación de IL10 no es detectable incluso tras la activación con Bactek® (datos no mostrados), no obstante su expresión podría incrementar modulada por la acción de la DC. Un fenómeno similar se ha descrito en epitelio intestinal que induce la liberación de IL10 en presencia de macrófagos activados por LPS [167]. En

cualquier caso el incremento en la liberación de IL10 inhibiría el fenotipo Th1 del linfocito T. Además la liberación de IL10 podría promover la diferenciación del 20% de los linfocitos hacia Treg, induciendo la expresión de FoxP3, que contribuiría a la inhibición observada del linfocito T CD4 efector.

Por lo tanto, el mecanismo por el que el contacto directo de célula epitelial junto con la célula dendrítica impide la activación en linfocitos T CD4 naïve e inhibe básicamente la diferenciación a Th1 no está aún descrito, aunque todo apunta a la existencia de factores solubles inhibitorios que solo se liberan cuando están en contacto directo: como mucinas inhibitorias (MUC-1, prostaglandinas, glucocorticoides o citoquinas inhibitorias [94, 168]).

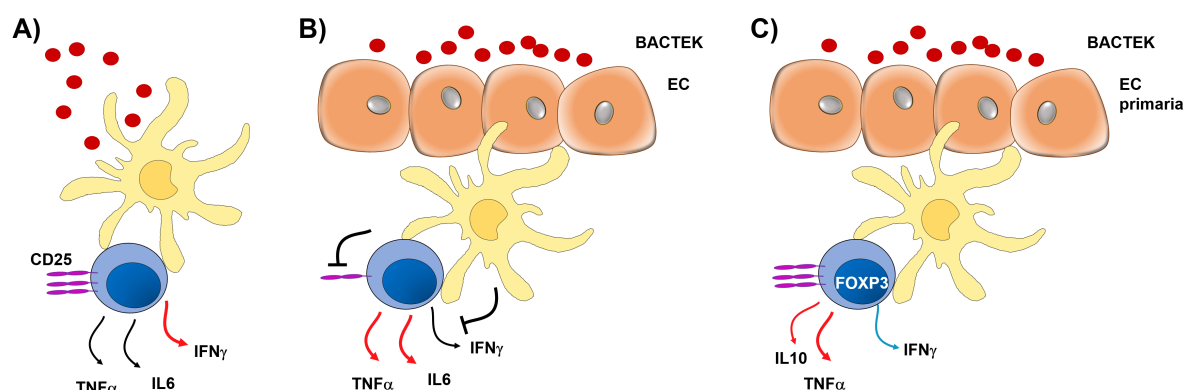


Figura 44. Diferenciación de LT CD4 naïve en presencia de DCs con Bactek®. A) Los LT CD4 diferenciados en presencia de la DC y Bactek® incrementa la expresión de CD25 del LT e incrementa la secreción de IFN γ . B) En presencia de la EC, los LT CD4 diferenciados con DC y Bactek® disminuyen su activación y se bloquea la secreción de IFN γ . C) En presencia de ECs primarias, los LT diferenciados con DCs y Bactek® mantienen su activación e incrementan la secreción de TNF α e IL10.

4. Inhibición de la respuesta Th1 de los linfocitos CD4 por contacto directo con las células epiteliales

Una vez analizado el condicionamiento que las células epiteliales ejercen sobre las células dendríticas y a su vez sobre la diferenciación de linfocitos CD4 naïve, donde observamos que se suprime la activación y la diferenciación hacia Th1. Quisimos conocer el tipo de condicionamiento que podría tener la célula epitelial directamente sobre el linfocito T, ya que en la mucosa hay una gran cantidad de linfocitos, entre los cuales el 80 % son T CD4.

Quisimos determinar el efecto de las células epiteliales directamente sobre la población de linfocitos T CD4, en contacto directo o a través de medios condicionados previamente por las células epiteliales. Estudiamos si se producía condicionamiento en el proceso de activación y diferenciación del linfocito T naïve tras su activación usando anticuerpos anti CD3 y anti-CD28. De igual forma quisimos determinar si la célula epitelial podría condicionar la respuesta de linfocitos T diferenciados in vitro hacia el perfil Th1 y bloquear un programa de diferenciación ya iniciado. Y con la misma metodología estudiamos el efecto de los linfocitos T CD4 totales cuando están en contacto con las células epiteliales, comprobando que ocurriría en una población heterogénea de linfocitos T, como podría ocurrir en el ambiente de la mucosa. Nuestros estudios de condicionamiento de linfocitos T CD4 naïve, T CD4 Th1 y

DISCUSIÓN

T CD4 totales, mostraron por una parte, que el medio condicionado por las células epiteliales de la mucosa oral no ejercían ningún tipo de condicionamiento. Sin embargo, en el contacto directo de la célula epitelial junto con los linfocitos T CD4 se producía una supresión de los niveles de $\text{IFN}\gamma$ detectados en los sobrenadantes, acompañado de una reducción drástica de los niveles de $\text{TNF}\alpha$ y un incremento de $\text{TGF}\beta$, no observando cambios con el tratamiento con Bactek® (Fig.45)

Son pocos los estudios realizados en los que se analice el efecto de la célula epitelial sobre el linfocito T, no obstante existen datos proporcionado por el grupo de Cruickshank, realizados con células epiteliales del colon en los que se ha descrito que el cultivo de las células epiteliales con linfocitos T en ausencia de células dendríticas disminuye la producción de $\text{IFN}\gamma$ y $\text{TNF}\alpha$ cuando están en contacto directo, mientras que no se veía afectada la activación ni la producción de citoquinas cuando los linfocitos T eran cultivados con medios condicionados por las células epiteliales [94]. Este efecto también se ha observado en células epiteliales de la retina, donde el contacto de estas células epiteliales junto con linfocitos T CD4 activados, inhibe la producción de $\text{IFN}\gamma$ y este efecto no es dependiente del $\text{TGF}\beta$, ya que al bloquearlo con anticuerpos solubles el efecto no era revertido [40, 169]. En estudios con células epiteliales biliares han demostrado que estas son capaces de inhibir directamente la activación de los linfocitos T incluso activándolos con PHA, anti-CD3 o con antígenos, comprueban por citometría de flujo que el marcador CD45RO es disminuido [10].

Por tanto nuestros datos están en entera consonancia con los descritos para otras células epiteliales las cuales disponen de mecanismos para suprimir en el linfocito T la producción de $\text{IFN}\gamma$ y $\text{TNF}\alpha$. Es remarcable que esta inhibición está acompañada por un aumento de hasta 10 veces de la producción de $\text{TGF}\beta$. Desconocemos exactamente si este incremento es debido a la actividad de la célula epitelial, si es liberado por el linfocito o la suma de ambos. No obstante si este aumento en la liberación de $\text{TGF}\beta$ se debe mayoritariamente a la actividad del linfocito T, podríamos proponer que el epitelio está induciendo en el linfocito T CD4 una polarización hacia linfocito Th3 productor de $\text{TGF}\beta$.

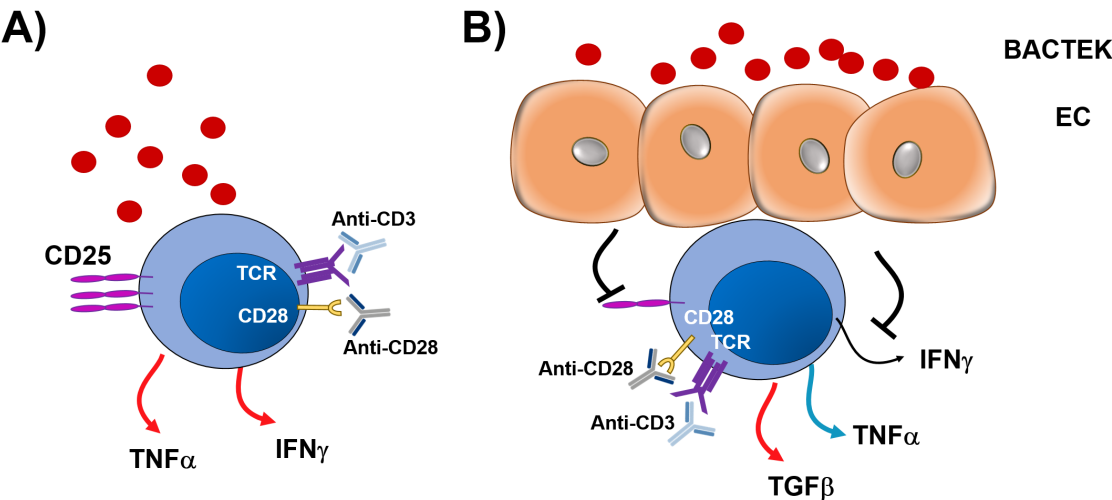


Figura 45. Respuesta de los linfocitos T activados con anti-CD3 y anti-CD28 a Bactek®. A) Los LT activados incrementan la expresión de CD25 y la secreción de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ en respuesta a Bactek. B) La presencia de la EC suprime la activación del LT CD4 y bloquea la liberación de $\text{IFN}\gamma$, disminuye la de $\text{TNF}\alpha$ e incrementa la secreción de $\text{TGF}\beta$.

5. Estudio de los mecanismos por los que las células epiteliales median la supresión de los linfocitos T CD4

Puesto que hemos observado que el contacto con las células epiteliales suprime la activación del linfocito T, así como inhibe la respuesta Th1 quisimos estudiar en mayor detalle los mecanismos de inhibición de la función de los linfocitos T CD4. Los análisis de expresión de los marcadores de activación CD25 y CD69 mostraron que el contacto con la célula epitelial induce una reducción en la expresión de los mismos. En consonancia con la disminución de CD25 observamos un descenso drástico en la proliferación de los linfocitos T cuando son cocultivados con células epiteliales. Esta disminución en la expresión de CD25 e inhibición de la proliferación celular ha sido descrita por otros como resultado del cultivo de los linfocitos T CD4 en contacto directo con células epiteliales del intestino, biliares o de la retina [10, 40, 94, 159] .

Se desconocen los mecanismo por los que se inhibe la expresión de CD25 y la proliferación celular del linfocito T. Efectos inhibidores del linfocito T similares a los ejercidos por las células epiteliales han sido descritos para las células estromales mesenquimales (MSC). Cocultivo en presencia de las MSC inhibe la expresión de CD25, CD69 en distinto tipos de linfocitos y los mecanismo de inhibición propuestos son la expresión de TGF β y HGF, sin embargo anticuerpos bloqueantes para estos factores no restablecen la expresión de CD25 y CD69 en los linfocitos T. Estudios recientes han demostrado que el efecto inhibidor que ejercen las MSC sobre los linfocitos T es mediado por el óxido nítrico (NO) liberado por la MSC que activa la vía mTOR para suprimir la expresión de CD25 [170]. Aunque este metabolito no ha sido estudiado en nuestro sistema, cabe destacar que las células epiteliales de la mucosa gastrointestinal producen óxido nítrico en un mecanismo dependiente de NF κ B [171]. Por otro lado diversos estudios en células epiteliales del colon indican que el NO incrementa la producción de IFN γ , TNF α e IL6 exacerbando la colitis ulcerosa [172]. Dado que en nuestro sistema se produce una inhibición de la proliferación y activación del linfocito T, acompañado de un bloqueo del perfil Th1 es difícil explicar el complejo fenotipo que induce la célula epitelial de la mucosa oral en el linfocito T basándonos solo en la liberación de NO.

Aunque los linfocitos T CD4 en contacto con las células epiteliales de la mucosa oral no proliferan, tampoco entran en un estado de muerte celular programada, como demuestran las tinciones con Anexina V y el marcador de viabilidad 7 ADD. Esta misma observación, una falta de apoptosis asociada a la inhibición de la activación del linfocito T, ha sido descrita por otros en estudios realizados cocultivando células epiteliales biliares con linfocitos T [10], en cocultivos de células epiteliales del colon con linfocitos T CD4 [94] o en células epiteliales tubulares del riñón [96].

En relación con la apoptosis, los últimos estudios indican que la muerte celular programada no deja indiferente a las células vecinas. En concreto las células epiteliales sufren de forma regular apoptosis como mecanismo de recambio celular, sin que se desarrolle un proceso de inflamación. Esta apoptosis parece ser que sirve como mecanismo para modular la actividad de las células dendríticas asociadas a la mucosa intestinal. En concreto la fosfatidilserina expuesta en la cara externa de la membrana en las células epiteliales apoptóticas interacciona con molécula CD300a en la célula dendrítica y señala inhibiendo la producción de IFN β [173] No podemos descartar que un proceso similar tenga lugar entre la célula epitelial y el linfocito T ya que el receptor CD300a se expresa también en linfocitos Th1. CD300a contiene un ITIM en su región citoplasmática que recluta fosfatasa como SHP-1, SHP-2 y SIHP inhi-

DISCUSIÓN

biendo la activación del linfocito T [174].

Otro mecanismo por el que se podría estar produciendo la supresión de la activación de los linfocitos T CD4 activados es a través de la molécula de TGF β liberada al medio ya que se le ha atribuido una función en el bloqueo de la proliferación y diferenciación a Th1 [175]. Por ello bloqueamos la unión de TGF β a su receptor añadiendo un anticuerpo anti-TGF β bloqueante en los cocultivos de células epiteliales de la mucosa oral junto a linfocitos T CD4. Sin embargo tras analizar los sobrenadantes del cocultivo no observamos cambios significativos en la secreción de IFN γ o TNF α , por lo que dedujimos que el TGF β no era el responsable de este efecto, ya que su bloqueo no era capaz de revertir la inhibición mediada por la célula epitelial. Distintos estudios proponen al TGF β como candidato de la supresión de la actividad de los linfocitos T condicionados por células epiteliales, sin embargo ninguno de ellos ha sido capaz de demostrar que esta citoquina sea la responsable de la supresión, proponiendo todos ellos la existencia de otros factores solubles inhibitorios además de la necesidad del contacto directo para que se lleve a cabo esta inhibición [13, 17, 94, 156, 157, 161]. Así, en el caso de estudios con células epiteliales del colon de ratón donde al bloquear el TGF β soluble con anticuerpos anti-TGF β y anti-LAP no son capaces de deshacer la inhibición de la progresión del ciclo celular que provoca la el contacto de las células epiteliales con los linfocitos T[94].

La inhibición inducida en el linfocito T CD4 por las células epiteliales parece ser parcialmente reversible. Los linfocitos T aislados del cocultivo y reactivados con antiCD3 y anti CD28 son capaces de producir TNF α y TGF β a niveles similares a los que produce un linfocito T CD4 activado en ausencia de condicionamiento por la célula epitelial. Sin embargo la producción de IFN γ se recupera parcialmente ya que representa solo un 25% del IFN γ producido por el linfocito T en ausencia de condicionamiento. En otros estudios, tras el aislamiento del cocultivo con células epiteliales del colon y la reestimulación de los LT CD4 con anti-CD3 o PMA/ ionomicina los LT CD4 activaron de nuevo el ciclo celular y volvieron a expresar altos niveles de CD25. También se observó que se recuperaba la proliferación de los linfocitos que habían sido cultivos con células epiteliales tubulares del riñón, tras aislarlos y estimularlos con anti-CD3 y anti-CD28 [94, 96].

Otra evidencia importante en nuestros estudios es que las células epiteliales son capaces de retirar las citoquinas IFN γ y TNF α liberadas al medio por el linfocito T. No obstante la retirada de estas citoquinas por la célula epitelial representa solo el 50% liberado por el linfocito al medio. Este consumo es una de las causas que contribuyen a la bajada de IFN γ pero por si solo no explica los bajos niveles de esta citoquina en el medio del cocultivo. El consumo de IFN γ y TNF α puede ser mediado por la presencia de receptores para estas dos citoquinas que en los análisis por microarrays veíamos expresados. Receptores de estas citoquinas se han descrito en el epitelio de las vías aéreas receptores tipo I y II de IFN γ [176-178], y en células epiteliales de colon, receptores de TNF α [179-182].

Puesto que los linfocitos no eran capaces de activarse, ni proliferar, pero tampoco estaban muriéndose, pensamos que posiblemente estén entrando en un estado de anergia, definiendo anergia como un estado duradero de inactividad total o parcial [105]. Nuestros datos no muestran que se esté sobreexpresando PD-1 en los linfocitos T CD4 cuando están en cultivo con las células epiteliales, todo lo contrario la expresión de este marcador disminuye en el cocultivo. Pensamos que esta inhibición es consecuencia de la falta de activación del linfocito T en el que no solo se inhibe la expresión de marcadores de activación tempranos como CD69 y CD25, sino que también inhibe marcadores de activación tardíos como

Nuestros datos sí que indican que tiene lugar un incremento de la expresión de MHC-II y CD40 en las células epiteliales cuando están en contacto directo con el linfocito T y con los medios condicionados de los LT CD4. No podemos descartar que las células epiteliales orales puedan presentar antígeno vía MHCII a los linfocitos T. Recientemente se ha descrito que células epiteliales de la retina pulsadas y cargadas con péptidos, pueden presentar antígeno a los linfocitos T CD4 induciendo en ellos un estado de anergia. Este estado se caracterizó porque los linfocitos T expresaron CD25, CD69 y CD44 en respuesta al antígeno sin embargo a pesar de que sobreviven no proliferaron ni producen citoquinas como IL2, IFN γ e IL17, manteniéndose en este estado irreversiblemente [183]. Es por tanto posible que las células epiteliales orales presenten antígenos a los linfocitos T CD4 induciendo en ellos un estado anérgico en el que los linfocitos sobrevivan, pero no expresan marcadores de activación ni proliferen.

Una molécula que recientemente ha adquirido relevancia por su papel en anergia y tolerancia oral es GRAIL, una E3 ubiquitin ligasa de transmembrana. Se ha implicado en la inducción de anergia en el linfocito T al marcar para su degradación a varias moléculas clave en la activación del linfocito T como el mismo TCR. Se ha descrito que esta molécula no solo tiene papel en anergia sino también en tolerancia oral. En ratones GRAIL $^{-/-}$ se observa una hiperactividad de los linfocitos con un incremento en la producción de IFN γ , pero no de IL4 o IL17, existiendo una ausencia de fenotipo anérgico y de tolerancia a antígenos administrados oralmente [184]. Desconocemos si esta molécula está implicada en la inducción de anergia observada en nuestros experimentos pero sería un buen candidato para explicar la falta de activación y proliferación de los linfocitos T CD4 en cultivo con células epiteliales de la mucosa oral.

En resumen, nuestros datos indican que distintos mecanismos podrían operar en el efecto que las células epiteliales de la mucosa oral ejercen sobre los linfocitos T CD4 con los que está en contacto directo. En ausencia de células dendríticas, la célula epitelial oral inhibe en el linfocito T la capacidad de liberar citoquinas proinflamatorias como IFN γ y TNF α . Además inhibe la expresión de marcadores de activación CD25, CD69 y PD-1 e inhibe su proliferación, todo ello sin afectar a su supervivencia. Este efecto no parece ser mediado por TGF β ya que su bloqueo no restablece, al menos, la liberación de citoquinas proinflamatorias. En contacto con la célula epitelial el linfocito T queda en un estado semi-refractario a nuevas activaciones. Todo esto apunta a que el linfocito T podría entrar en un estado de anergia. Dicha anergia podría estar inducida por el aumento en la expresión de moléculas MHC-II en el epitelio oral en ausencia de coestimulación, o por la existencia de otros factores supresores de activación. Adicionalmente, en presencia de la célula dendrítica y el epitelio oral primario, el linfocito T adquiere un fenotipo regulador que junto a la anergia contribuiría al mantenimiento de la tolerancia oral.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Las células epiteliales orales primarias pueden mantenerse en cultivo durante al menos 8 días en medio CNT-24 carente de suero.
2. Las líneas epiteliales orales H413 y TR146 expresan CD40 de manera constitutiva. El tratamiento con Bactek® y particularmente con IFN γ de estas células induce además la expresión de MHC-I, MHC-II y moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. Las células epiteliales primarias solo expresan cantidades significativas de MHC-II tras el tratamiento con IFN γ .
3. Las líneas epiteliales orales H413 y TR146 secretan IL6, IL8 y TGF β de manera constitutiva. El tratamiento con Bactek® incrementa la secreción de IL6 e IL8. Las células epiteliales primarias solo producen cantidades significativas de TGF β y su secreción disminuye con el tratamiento con Bactek®.
4. Las células dendríticas estimuladas con Bactek® en presencia de células epiteliales o medios condicionados por estas células maduran parcialmente y secretan patrones diferentes de citoquinas a los liberados en ausencia de condicionamiento epitelial. Particularmente hay una disminución dramática de la secreción de IL12 y un aumento de IL10.
5. El primado de linfocitos T CD4 naïve con células dendríticas expuestas a Bactek® en contacto con células epiteliales primarias induce la expansión de linfocitos no productores de IFN γ con aumento de una población de linfocitos T CD4 CD25⁺FoxP3⁺. En cambio, la activación/diferenciación de linfocitos T CD4 está bloqueada cuando se emplean las líneas epiteliales H413 y TR146.
6. El contacto directo de las células epiteliales de la mucosa oral con linfocitos T CD4 (naïve, Th1 o totales) estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 bloquea la liberación de IFN γ y TNF α e incrementa la de TGF β .
7. El contacto directo de células epiteliales H413 con linfocitos T CD4 bloquea su activación con anti-CD3 y anti-CD28, a juzgar por los bajos niveles de expresión de CD25, CD69 y de proliferación, sin inducir expresión de PD1, apoptosis o muerte del linfocito T.
8. El TGF β no es el responsable de la inhibición de activación de los linfocitos T en contacto con las células epiteliales, ya que el uso de anticuerpos bloqueantes no revierte la inhibición de IFN γ y TNF α .
9. Los linfocitos T CD4 condicionados por células epiteliales H413 quedan en un estado de semi-energía, no produciendo niveles normales de IFN γ cuando son reestimulados con anti-CD3 y anti-CD28.
10. Los linfocitos T CD4 activados con anti-CD3 y anti-CD28 condicionan la respuesta de las células epiteliales H413, incrementando su expresión de MHC-I, MHC-II.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Shojaei, A.H., *Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review*. J Pharm Pharm Sci, 1998. **1**(1): p. 15-30.
2. Novak, N., et al., *The immune privilege of the oral mucosa*. Trends Mol Med, 2008. **14**(5): p. 191-8.
3. Meyer, T., R. Ullrich, and M. Zeitz, *Oral tolerance induction in humans*. Exp Mol Pathol, 2012. **93**(3): p. 449-54.
4. Feller, L., et al., *Oral mucosal immunity*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2013. **116**(5): p. 576-83.
5. Wu, R.Q., et al., *The mucosal immune system in the oral cavity-an orchestra of T cell diversity*. Int J Oral Sci, 2014. **6**(3): p. 125-32.
6. Ohtsuka, Y., *Food intolerance and mucosal inflammation*. Pediatr Int, 2015. **57**(1): p. 22-9.
7. Hovav, A.H., *Dendritic cells of the oral mucosa*. Mucosal Immunol, 2014. **7**(1): p. 27-37.
8. Schwiebert, L.M., et al., *Modulation of MHC class II expression in human cells by dexamethasone*. Cell Immunol, 1995. **165**(1): p. 12-9.
9. Yumoto, H., et al., *Interleukin-6 (IL-6) and IL-8 are induced in human oral epithelial cells in response to exposure to periodontopathic Eikenella corrodens*. Infect Immun, 1999. **67**(1): p. 384-94.
10. Cruickshank, S.M., et al., *Inhibition of T cell activation by normal human biliary epithelial cells*. J Hepatol, 1999. **31**(6): p. 1026-33.
11. Han, D.C., et al., *Expression of MHC Class II, CD70, CD80, CD86 and pro-inflammatory cytokines is differentially regulated in oral epithelial cells following bacterial challenge*. Oral Microbiol Immunol, 2003. **18**(6): p. 350-8.
12. Lan, J.G., et al., *Different cytokine response of primary colonic epithelial cells to commensal bacteria*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(22): p. 3375-84.
13. Rimoldi, M., et al., *Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells*. Nat Immunol, 2005. **6**(5): p. 507-14.
14. Keir, M.E., et al., *Programmed death-1 (PD-1):PD-ligand 1 interactions inhibit TCR-mediated positive selection of thymocytes*. J Immunol, 2005. **175**(11): p. 7372-9.
15. Iliev, I.D., et al., *Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells*. Gut, 2009. **58**(11): p. 1481-9.
16. Alexandropoulos, K. and N.M. Danzl, *Thymic epithelial cells: antigen presenting cells that regulate T cell repertoire and tolerance development*. Immunol Res, 2012. **54**(1-3): p. 177-90.
17. Papazian, D., S. Hansen, and P.A. Wurtzen, *Airway responses towards allergens - from the airway epithelium to T cells*. Clin Exp Allergy, 2015. **45**(8): p. 1268-87.
18. Moingeon, P. and L. Mascarell, *Induction of tolerance via the sublingual route: mechanisms and applications*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 623474.
19. Moingeon, P., *Update on immune mechanisms associated with sublingual immunotherapy: practical implications for the clinician*. J Allergy Clin Immunol Pract, 2013. **1**(3): p. 228-41.

BIBLIOGRAFÍA

20. Allam, J.P. and N. Novak, *Immunological mechanisms of sublingual immunotherapy*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2014. **14**(6): p. 564-9.
21. Jay, D.C. and K.C. Nadeau, *Immune mechanisms of sublingual immunotherapy*. Curr Allergy Asthma Rep, 2014. **14**(11): p. 473.
22. Kim, S.H. and Y.S. Jang, *The development of mucosal vaccines for both mucosal and systemic immune induction and the roles played by adjuvants*. Clin Exp Vaccine Res, 2017. **6**(1): p. 15-21.
23. Squier, C.A. and M.J. Kremer, *Biology of oral mucosa and esophagus*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2001(29): p. 7-15.
24. Biragyn, A., et al., *Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2*. Science, 2002. **298**(5595): p. 1025-9.
25. Stowell, S.R., et al., *Innate immune lectins kill bacteria expressing blood group antigen*. Nat Med, 2010. **16**(3): p. 295-301.
26. Khurshid, Z., et al., *Oral antimicrobial peptides: Types and role in the oral cavity*. Saudi Pharm J, 2016. **24**(5): p. 515-524.
27. Hooper, L.V., *Epithelial cell contributions to intestinal immunity*. Adv Immunol, 2015. **126**: p. 129-72.
28. Salik, E., et al., *Antigen trafficking and accessory cell function in respiratory epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **21**(3): p. 365-79.
29. Beklen, A., et al., *Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 1-10 in periodontitis*. Oral Microbiol Immunol, 2008. **23**(5): p. 425-31.
30. Mori, Y., et al., *Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis*. Oral Microbiol Immunol, 2003. **18**(1): p. 54-8.
31. Uehara, A., S. Sugawara, and H. Takada, *Priming of human oral epithelial cells by interferon-gamma to secrete cytokines in response to lipopolysaccharides, lipoteichoic acids and peptidoglycans*. J Med Microbiol, 2002. **51**(8): p. 626-34.
32. Ronald, P.C. and B. Beutler, *Plant and animal sensors of conserved microbial signatures*. Science, 2010. **330**(6007): p. 1061-4.
33. Hemmi, H., et al., *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. Nature, 2000. **408**(6813): p. 740-5.
34. Nakagawa, R., et al., *SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses*. Immunity, 2002. **17**(5): p. 677-87.
35. Kumar, A., J. Zhang, and F.S. Yu, *Toll-like receptor 2-mediated expression of beta-defensin-2 in human corneal epithelial cells*. Microbes Infect, 2006. **8**(2): p. 380-9.
36. Ryu, J.H., et al., *Distinct TLR-mediated pathways regulate house dust mite-induced allergic disease in the upper and lower airways*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(2): p. 549-61.
37. Fazeli, A., C. Bruce, and D.O. Anumba, *Characterization of Toll-like receptors in the female reproductive tract in humans*. Hum Reprod, 2005. **20**(5): p. 1372-8.
38. Beklen, A., T. Sorsa, and Y.T. Konttinen, *Toll-like receptors 2 and 5 in human gingival epithelial cells co-operate with T-cell cytokine interleukin-17*. Oral Microbiol Immunol, 2009. **24**(1): p. 38-42.

39. Gewirtz, A.T., et al., *Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 1882-5.
40. Sugita, S., et al., *Inhibition of T-cell activation by retinal pigment epithelial cells derived from induced pluripotent stem cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015. **56**(2): p. 1051-62.
41. Zhang, Z., et al., *Human airway epithelial cells sense Pseudomonas aeruginosa infection via recognition of flagellin by Toll-like receptor 5*. Infect Immun, 2005. **73**(11): p. 7151-60.
42. Joseph, T., et al., *Induction of cyclooxygenase (COX)-2 in human vaginal epithelial cells in response to TLR ligands and TNF-alpha*. Am J Reprod Immunol, 2012. **67**(6): p. 482-90.
43. Kim, Y., et al., *Toll-like receptor 9 mediates oral bacteria-induced IL-8 expression in gingival epithelial cells*. Immunol Cell Biol, 2012. **90**(6): p. 655-63.
44. Hemmi, H., et al., *The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3059-64.
45. Chamaillard, M., et al., *An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid*. Nat Immunol, 2003. **4**(7): p. 702-7.
46. Girardin, S.E., et al., *Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2*. J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 41702-8.
47. Girardin, S.E., et al., *Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 8869-72.
48. Girardin, S.E., et al., *Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan*. Science, 2003. **300**(5625): p. 1584-7.
49. Inohara, N. and G. Nunez, *NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(5): p. 371-82.
50. Inohara, N., et al., *Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 5509-12.
51. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.
52. Wlodarska, M., et al., *NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion*. Cell, 2014. **156**(5): p. 1045-59.
53. Nakazawa, A., et al., *Functional expression of costimulatory molecule CD86 on epithelial cells in the inflamed colonic mucosa*. Gastroenterology, 1999. **117**(3): p. 536-45.
54. Thelemann, C., et al., *Interferon-gamma induces expression of MHC class II on intestinal epithelial cells and protects mice from colitis*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e86844.
55. Gaglia, J.L., et al., *Intercellular adhesion molecule 1 is critical for activation of CD28-deficient T cells*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6091-8.
56. Black, A.P., et al., *Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4+ and CD8+ T cells*. Eur J Immunol, 2007. **37**(6): p. 1485-93.
57. Takizawa, R., et al., *Increased expression of HLA-DR and CD86 in nasal epithelial cells in allergic rhinitis: antigen presentation to T cells and up-regulation by diesel exhaust particles*. Clin Exp Allergy, 2007. **37**(3): p. 420-33.

BIBLIOGRAFÍA

58. Soumelis, V., et al., *Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP*. Nat Immunol, 2002. **3**(7): p. 673-80.
59. Konkel, J.E. and W. Chen, *Balancing acts: the role of TGF-beta in the mucosal immune system*. Trends Mol Med, 2011. **17**(11): p. 668-76.
60. Macpherson, A.J. and T. Uhr, *Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria*. Science, 2004. **303**(5664): p. 1662-5.
61. Suzuki, K., et al., *Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 1981-6.
62. Benjamin, J.L., et al., *Intestinal epithelial autophagy is essential for host defense against invasive bacteria*. Cell Host Microbe, 2013. **13**(6): p. 723-34.
63. Conway, K.L., et al., *Atg16l1 is required for autophagy in intestinal epithelial cells and protection of mice from Salmonella infection*. Gastroenterology, 2013. **145**(6): p. 1347-57.
64. Zhao, Y., et al., *Autophagy is induced by UVA and promotes removal of oxidized phospholipids and protein aggregates in epidermal keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(6): p. 1629-37.
65. Inoue, D., et al., *Inducible disruption of autophagy in the lung causes airway hyper-responsiveness*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **405**(1): p. 13-8.
66. Macpherson, A.J., et al., *A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria*. Science, 2000. **288**(5474): p. 2222-6.
67. He, B., et al., *Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL*. Immunity, 2007. **26**(6): p. 812-26.
68. Allam, J.P., et al., *Distribution of Langerhans cells and mast cells within the human oral mucosa: new application sites of allergens in sublingual immunotherapy?* Allergy, 2008. **63**(6): p. 720-7.
69. Jotwani, R. and C.W. Cutler, *Multiple dendritic cell (DC) subpopulations in human gingiva and association of mature DCs with CD4+ T-cells in situ*. J Dent Res, 2003. **82**(9): p. 736-41.
70. Segulier, S., et al., *Langerin+ versus CD1a+ Langerhans cells in human gingival tissue: a comparative and quantitative immunohistochemical study*. Arch Oral Biol, 2003. **48**(4): p. 255-62.
71. Ito, H., et al., *Three-dimensional appearance of Langerhans cells in human gingival epithelium as revealed by confocal laser scanning microscopy*. Arch Oral Biol, 1998. **43**(9): p. 741-4.
72. Santoro, A., et al., *Recruitment of dendritic cells in oral lichen planus*. J Pathol, 2005. **205**(4): p. 426-34.
73. Scott, C.L., A.M. Aumeunier, and A.M. Mowat, *Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance?* Trends Immunol, 2011. **32**(9): p. 412-9.
74. Gonzalez-Rey, E. and M. Delgado, *Therapeutic treatment of experimental colitis with regulatory dendritic cells generated with vasoactive intestinal peptide*. Gastroenterology, 2006. **131**(6): p. 1799-811.
75. Aramaki, O., et al., *Differential expression of co-signal molecules and migratory properties in four distinct subsets of migratory dendritic cells from the oral mucosa*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **413**(3): p. 407-13.
76. Arizon, M., et al., *Langerhans cells down-regulate inflammation-driven alveolar bone loss*.

- Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(18): p. 7043-8.
77. Iliev, I.D., G. Matteoli, and M. Rescigno, *The yin and yang of intestinal epithelial cells in controlling dendritic cell function*. J Exp Med, 2007. **204**(10): p. 2253-7.
 78. Michea, P., et al., *Epithelial control of the human pDC response to extracellular bacteria*. Eur J Immunol, 2013. **43**(5): p. 1264-73.
 79. Hearps, A.C., et al., *Vaginal lactic acid elicits an anti-inflammatory response from human cervicovaginal epithelial cells and inhibits production of pro-inflammatory mediators associated with HIV acquisition*. Mucosal Immunol, 2017.
 80. Kobayashi, M., et al., *Short-chain fatty acids, GPR41 and GPR43 ligands, inhibit TNF-alpha-induced MCP-1 expression by modulating p38 and JNK signaling pathways in human renal cortical epithelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2017. **486**(2): p. 499-505.
 81. Dutzan, N., et al., *Characterization of the human immune cell network at the gingival barrier*. Mucosal Immunol, 2016. **9**(5): p. 1163-72.
 82. Sanchez Rodriguez, R., et al., *Memory regulatory T cells reside in human skin*. J Clin Invest, 2014. **124**(3): p. 1027-36.
 83. Sathaliyawala, T., et al., *Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets*. Immunity, 2013. **38**(1): p. 187-97.
 84. Teijaro, J.R., et al., *Cutting edge: Tissue-retentive lung memory CD4 T cells mediate optimal protection to respiratory virus infection*. J Immunol, 2011. **187**(11): p. 5510-4.
 85. Schenkel, J.M., et al., *Sensing and alarm function of resident memory CD8(+) T cells*. Nat Immunol, 2013. **14**(5): p. 509-13.
 86. van Wijk, F. and H. Cheroutre, *Mucosal T cells in gut homeostasis and inflammation*. Expert Rev Clin Immunol, 2010. **6**(4): p. 559-66.
 87. Kurashima, Y., Y. Goto, and H. Kiyono, *Mucosal innate immune cells regulate both gut homeostasis and intestinal inflammation*. Eur J Immunol, 2013. **43**(12): p. 3108-15.
 88. Kurashima, Y. and H. Kiyono, *Mucosal Ecological Network of Epithelium and Immune Cells for Gut Homeostasis and Tissue Healing*. Annu Rev Immunol, 2017.
 89. Weiner, H.L., *Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells*. Microbes Infect, 2001. **3**(11): p. 947-54.
 90. Weiner, H.L., *Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells*. Immunol Rev, 2001. **182**: p. 207-14.
 91. Coombes, J.L., et al., *A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1757-64.
 92. Romani, L., *Immunity to fungal infections*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(4): p. 275-88.
 93. Cohen, M.S., et al., *Acute HIV-1 Infection*. N Engl J Med, 2011. **364**(20): p. 1943-54.
 94. Cruickshank, S.M., *Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation*. Gut, 2004. **53**(5): p. 678-684.
 95. Aldajani, W.A., et al., *Expression and regulation of immune-modulatory enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) by human airway epithelial cells and its effect on T cell activation*. On-

BIBLIOGRAFÍA

- cotarget, 2016. **7**(36): p. 57606-57617.
96. Demmers, M.W., et al., *Human renal tubular epithelial cells suppress alloreactive T cell proliferation*. Clin Exp Immunol, 2015. **179**(3): p. 509-19.
97. Weiner, H.L., et al., *Oral tolerance*. Immunol Rev, 2011. **241**(1): p. 241-59.
98. Akdis, C.A. and M. Akdis, *Mechanisms of immune tolerance to allergens: role of IL-10 and Tregs*. J Clin Invest, 2014. **124**(11): p. 4678-80.
99. Mantel, P.Y. and C.B. Schmidt-Weber, *Transforming growth factor-beta: recent advances on its role in immune tolerance*. Methods Mol Biol, 2011. **677**: p. 303-38.
100. Gorelik, L., S. Constant, and R.A. Flavell, *Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation*. J Exp Med, 2002. **195**(11): p. 1499-505.
101. Taylor, A., et al., *IL-10 inhibits CD28 and ICOS costimulations of T cells via src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(1): p. 76-83.
102. Couper, K.N., D.G. Blount, and E.M. Riley, *IL-10: the master regulator of immunity to infection*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 5771-7.
103. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
104. Francisco, L.M., P.T. Sage, and A.H. Sharpe, *The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity*. Immunol Rev, 2010. **236**: p. 219-42.
105. Lechler, R., et al., *The contributions of T-cell anergy to peripheral T-cell tolerance*. Immunology, 2001. **103**(3): p. 262-9.
106. Quill, H. and R.H. Schwartz, *Stimulation of normal inducer T cell clones with antigen presented by purified Ia molecules in planar lipid membranes: specific induction of a long-lived state of proliferative nonresponsiveness*. J Immunol, 1987. **138**(11): p. 3704-12.
107. Walunas, T.L., C.Y. Bakker, and J.A. Bluestone, *CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation*. J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2541-50.
108. Fife, B.T. and J.A. Bluestone, *Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways*. Immunol Rev, 2008. **224**: p. 166-82.
109. Sloan-Lancaster, J., et al., *Partial T cell signaling: altered phospho-zeta and lack of zap70 recruitment in APL-induced T cell anergy*. Cell, 1994. **79**(5): p. 913-22.
110. Holmgren, J. and C. Czerkinsky, *Mucosal immunity and vaccines*. Nat Med, 2005. **11**(4 Suppl): p. S45-53.
111. Brandtzaeg, P., *Potential of nasopharynx-associated lymphoid tissue for vaccine responses in the airways*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(12): p. 1595-604.
112. Alecsandru, D., et al., *Sublingual therapeutic immunization with a polyvalent bacterial preparation in patients with recurrent respiratory infections: immunomodulatory effect on antigen-specific memory CD4+ T cells and impact on clinical outcome*. Clin Exp Immunol, 2011. **164**(1): p. 100-7.
113. Benito-Villalvilla, C., et al., *MV140, a sublingual polyvalent bacterial preparation to treat recurrent urinary tract infections, licenses human dendritic cells for generating Th1, Th17, and IL-10 responses via Syk and MyD88*. Mucosal Immunol, 2016.

114. Niederberger, V., et al., *Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101 Suppl 2**: p. 14677-82.
115. Valenta, R., et al., *Immunotherapy of allergic disease*. Adv Immunol, 2004. **82**: p. 105-53.
116. Vrtala, S., et al., *Strategies for converting allergens into hypoallergenic vaccine candidates*. Methods, 2004. **32**(3): p. 313-20.
117. Stathopoulou, P.G., et al., *Epithelial cell pro-inflammatory cytokine response differs across dental plaque bacterial species*. J Clin Periodontol, 2010. **37**(1): p. 24-9.
118. Yee, M., et al., *Porphyromonas gingivalis stimulates IL-6 and IL-8 secretion in GSM-K, HSC-3 and H413 oral epithelial cells*. Anaerobe, 2014. **28**: p. 62-7.
119. Sorenson, B.S., et al., *IL-1 receptor regulates S100A8/A9-dependent keratinocyte resistance to bacterial invasion*. Mucosal Immunol, 2012. **5**(1): p. 66-75.
120. Zaia, A.A., et al., *Subversion of antimicrobial calprotectin (S100A8/S100A9 complex) in the cytoplasm of TR146 epithelial cells after invasion by Listeria monocytogenes*. Mucosal Immunol, 2009. **2**(1): p. 43-53.
121. Kohli, A., et al., *Oral and vaginal epithelial cell lines bind and transfer cell-free infectious HIV-1 to permissive cells but are not productively infected*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e98077.
122. Pistone, S., et al., *Formulation of polysaccharide-based nanoparticles for local administration into the oral cavity*. Eur J Pharm Sci, 2017. **96**: p. 381-389.
123. Klemetsrud, T., et al., *Polymer coated liposomes for use in the oral cavity - a study of the in vitro toxicity, effect on cell permeability and interaction with mucin*. J Liposome Res, 2016: p. 1-12.
124. Hennings, H., et al., *Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture*. Cell, 1980. **19**(1): p. 245-54.
125. Abraham, G., et al., *Growth and differentiation of primary and passaged equine bronchial epithelial cells under conventional and air-liquid-interface culture conditions*. BMC Vet Res, 2011. **7**: p. 26.
126. Zissel, G., et al., *Human alveolar epithelial cells type II are capable of regulating T-cell activity*. J Investig Med, 2000. **48**(1): p. 66-75.
127. Sandros, J., et al., *Cytokine responses of oral epithelial cells to Porphyromonas gingivalis infection*. J Dent Res, 2000. **79**(10): p. 1808-14.
128. Rescigno, M., *Plasmacytoid DCs are gentle guardians of tonsillar epithelium*. Eur J Immunol, 2013. **43**(5): p. 1142-6.
129. Fielding, C.A., et al., *Interleukin-6 signaling drives fibrosis in unresolved inflammation*. Immunity, 2014. **40**(1): p. 40-50.
130. Boussiotis, V.A., *Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway*. N Engl J Med, 2016. **375**(18): p. 1767-1778.
131. Wakem, P., et al., *Allergens and irritants transcriptionally upregulate CD80 gene expression in human keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2000. **114**(6): p. 1085-92.
132. Wakem, P., et al., *Heterogeneity of CD80 gene transcription by human keratinocytes to allergens and irritants: relevance to allergic contact dermatitis in vivo*. J Appl Toxicol, 2004. **24**(6): p. 485-92.

BIBLIOGRAFÍA

133. Sanderson, I.R., et al., *Differential regulation of B7 mRNA in enterocytes and lymphoid cells*. Immunology, 1993. **79**(3): p. 434-8.
134. Miyauchi, E., et al., *Bifidobacterium longum alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis by suppressing IL-17A response: involvement of intestinal epithelial costimulatory molecules*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79735.
135. Dugger, K., et al., *Epithelial cells as immune effector cells: the role of CD40*. Semin Immunol, 2009. **21**(5): p. 289-92.
136. Kim, J., et al., *Constitutive and inducible expression of b7 family of ligands by human airway epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **33**(3): p. 280-9.
137. Propst, S.M., et al., *Proinflammatory and Th2-derived cytokines modulate CD40-mediated expression of inflammatory mediators in airway epithelia: implications for the role of epithelial CD40 in airway inflammation*. J Immunol, 2000. **165**(4): p. 2214-21.
138. Hershberg, R.M., et al., *Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells*. J Clin Invest, 1998. **102**(4): p. 792-803.
139. Hershberg, R.M. and L.F. Mayer, *Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity*. Immunol Today, 2000. **21**(3): p. 123-8.
140. Brandtzaeg, P. and F.E. Johansen, *Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties*. Immunol Rev, 2005. **206**: p. 32-63.
141. Blumberg, R.S., et al., *Antigen presentation by intestinal epithelial cells*. Immunol Lett, 1999. **69**(1): p. 7-11.
142. Kishimoto, T., *Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 1-21.
143. Hodge, D.R., E.M. Hurt, and W.L. Farrar, *The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer*. Eur J Cancer, 2005. **41**(16): p. 2502-12.
144. Schafer, Z.T. and J.S. Brugge, *IL-6 involvement in epithelial cancers*. J Clin Invest, 2007. **117**(12): p. 3660-3.
145. Hedges, S., M. Svensson, and C. Svanborg, *Interleukin-6 response of epithelial cell lines to bacterial stimulation in vitro*. Infect Immun, 1992. **60**(4): p. 1295-301.
146. Vitkus, S.J., S.A. Hanifin, and D.W. McGee, *Factors affecting Caco-2 intestinal epithelial cell interleukin-6 secretion*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1998. **34**(8): p. 660-4.
147. Chow, A.W., et al., *Polarized secretion of interleukin (IL)-6 and IL-8 by human airway epithelia 16HBE14o- cells in response to cationic polypeptide challenge*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12091.
148. Huang, G.T., et al., *Differential expression of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by human gingival epithelial cells in response to Actinobacillus actinomycetemcomitans or Porphyromonas gingivalis infection*. Oral Microbiol Immunol, 1998. **13**(5): p. 301-9.
149. Rieder, G., et al., *Role of adherence in interleukin-8 induction in Helicobacter pylori-associated gastritis*. Infect Immun, 1997. **65**(9): p. 3622-30.
150. Crowe, S.E., et al., *Expression of interleukin 8 and CD54 by human gastric epithelium after Helicobacter pylori infection in vitro*. Gastroenterology, 1995. **108**(1): p. 65-74.
151. Denney, L., et al., *Pulmonary Epithelial Cell-Derived Cytokine TGF-beta1 Is a Critical Cofac-*

- tor for Enhanced Innate Lymphoid Cell Function*. Immunity, 2015. **43**(5): p. 945-58.
152. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
 153. Travis, M.A. and D. Sheppard, *TGF-beta activation and function in immunity*. Annu Rev Immunol, 2014. **32**: p. 51-82.
 154. Li, M.O. and R.A. Flavell, *TGF-beta: a master of all T cell trades*. Cell, 2008. **134**(3): p. 392-404.
 155. Spisek, R., et al., *Maturation of dendritic cells by bacterial immunomodulators*. Vaccine, 2004. **22**(21-22): p. 2761-8.
 156. Papazian, D., et al., *Direct contact between dendritic cells and bronchial epithelial cells inhibits T cell recall responses towards mite and pollen allergen extracts in vitro*. Clin Exp Immunol, 2015. **181**(2): p. 207-18.
 157. Papazian, D., et al., *Effect of Polarization on Airway Epithelial Conditioning of Monocyte-Derived Dendritic Cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2015. **53**(3): p. 368-77.
 158. Kronsteiner, B., et al., *Human mesenchymal stem cells and renal tubular epithelial cells differentially influence monocyte-derived dendritic cell differentiation and maturation*. Cell Immunol, 2011. **267**(1): p. 30-8.
 159. Sugita, S., et al., *Mature dendritic cell suppression by IL-1 receptor antagonist on retinal pigment epithelium cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. **54**(5): p. 3240-9.
 160. Rimoldi, M., et al., *Corrigendum: Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells*. Nat Immunol, 2015. **16**(3): p. 326.
 161. Butler, M., et al., *Modulation of dendritic cell phenotype and function in an in vitro model of the intestinal epithelium*. Eur J Immunol, 2006. **36**(4): p. 864-74.
 162. Zoumpopoulou, G., et al., *Differential crosstalk between epithelial cells, dendritic cells and bacteria in a co-culture model*. Int J Food Microbiol, 2009. **131**(1): p. 40-51.
 163. Tiscornia, I., et al., *Human monocyte-derived dendritic cells from leukoreduction system chambers after plateletpheresis are functional in an in vitro co-culture assay with intestinal epithelial cells*. J Immunol Methods, 2012. **384**(1-2): p. 164-70.
 164. Saperstein, S., et al., *IL-1beta augments TNF-alpha-mediated inflammatory responses from lung epithelial cells*. J Interferon Cytokine Res, 2009. **29**(5): p. 273-84.
 165. Wang, H., Z. Su, and J. Schwarze, *Healthy but not RSV-infected lung epithelial cells profoundly inhibit T cell activation*. Thorax, 2009. **64**(4): p. 283-90.
 166. Lim, S., et al., *Differential expression of IL-10 receptor by epithelial cells and alveolar macrophages*. Allergy, 2004. **59**(5): p. 505-14.
 167. Kim, H.J., et al., *Contributions of microbiome and mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human gut-on-a-chip*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(1): p. E7-15.
 168. Weitnauer, M., V. Mijosek, and A.H. Dalpke, *Control of local immunity by airway epithelial cells*. Mucosal Immunol, 2016. **9**(2): p. 287-98.
 169. Gardner, P.J., et al., *SIRT1 activation protects against autoimmune T cell-driven retinal disease*

BIBLIOGRAFÍA

- in mice via inhibition of IL-2/Stat5 signaling.* J Autoimmun, 2013. **42**: p. 117-29.
170. Yoo, H.S., et al., *Mesenchymal stromal cells inhibit CD25 expression via the mTOR pathway to potentiate T-cell suppression.* Cell Death Dis, 2017. **8**(2): p. e2632.
171. Lahde, M., R. Korhonen, and E. Moilanen, *Regulation of nitric oxide production in cultured human T84 intestinal epithelial cells by nuclear factor-kappa B-dependent induction of inducible nitric oxide synthase after exposure to bacterial endotoxin.* Aliment Pharmacol Ther, 2000. **14**(7): p. 945-54.
172. Kankuri, E., et al., *Suppression of pro-inflammatory cytokine release by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in mucosal explants from patients with ulcerative colitis.* Scand J Gastroenterol, 2003. **38**(2): p. 186-92.
173. Nakahashi-Oda, C., et al., *Apoptotic epithelial cells control the abundance of Treg cells at barrier surfaces.* Nat Immunol, 2016. **17**(4): p. 441-50.
174. Borrego, F., *The CD300 molecules: an emerging family of regulators of the immune system.* Blood, 2013. **121**(11): p. 1951-60.
175. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, *Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta.* J Exp Med, 2001. **194**(5): p. 629-44.
176. Ciencewicki, J.M., L.E. Brighton, and I. Jaspers, *Localization of type I interferon receptor limits interferon-induced TLR3 in epithelial cells.* J Interferon Cytokine Res, 2009. **29**(5): p. 289-97.
177. Humlicek, A.L., et al., *Paracellular permeability restricts airway epithelial responses to selectively allow activation by mediators at the basolateral surface.* J Immunol, 2007. **178**(10): p. 6395-403.
178. de Weerd, N.A. and T. Nguyen, *The interferons and their receptors--distribution and regulation.* Immunol Cell Biol, 2012. **90**(5): p. 483-91.
179. Janes, K.A., et al., *The response of human epithelial cells to TNF involves an inducible auto-crine cascade.* Cell, 2006. **124**(6): p. 1225-39.
180. Mizoguchi, E., et al., *Role of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in colonic epithelial hyperplasia and chronic intestinal inflammation in mice.* Gastroenterology, 2002. **122**(1): p. 134-44.
181. MacEwan, D.J., *TNF ligands and receptors--a matter of life and death.* Br J Pharmacol, 2002. **135**(4): p. 855-75.
182. Al-Lamki, R.S., et al., *Tumor necrosis factor receptor expression and signaling in renal cell carcinoma.* Am J Pathol, 2010. **177**(2): p. 943-54.
183. Gregerson, D.S., et al., *Interaction of retinal pigmented epithelial cells and CD4 T cells leads to T-cell anergy.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(10): p. 4654-63.
184. Kriegel, M.A., C. Rathinam, and R.A. Flavell, *E3 ubiquitin ligase GRAIL controls primary T cell activation and oral tolerance.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(39): p. 16770-5.

ANEXOS

ANEXOS

CURRICULUM VITAE

Datos de contacto:

M^a Magdalena Molero Abraham

Correo electrónico: mmoler02@ucm.es

Formación académica

- Licenciatura de Biología. Universidad de Jaén (2007-2011).
- Máster en Biotecnología y Biomedicina. Universidad de Jaén (2011-2012).
- Matriculada en Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid (2013-actualidad)

Publicaciones:

- Molero-Abraham M, Glutting JP, Flower DR, Lafuente EM, Reche PA (2015). **EPIPOX: Immunoinformatic Characterization of the Shared T-Cell Epitome between Variola Virus and Related Pathogenic Orthopoxviruses.** J Immunol Res. 2015; 2015:738020. PMID: 26605344
- Molero-Abraham M, Lafuente EM & Reche PA (2014). **Customized predictions of peptide-MHC binding and T cell epitopes using EPIMHC.** Methods Mol Biol. 2014;1184:319-32 PMID: 25048133
- Molero-Abraham M, Lafuente EM Flower DR, Reche PA (2013) **Selection of conserved epitopes from hepatitis C virus for pan-population stimulation of T cell responses, Clin. and Devel. Immunol., Volume 2013, Article ID 601943**

Participación en congresos

- Autores: Magdalena Molero-Abraham, Esther M. Lafuente and Pedro Reche

Título: Modulation and conditioning of the T cell responses by epithelial cells

Tipo de participación: Comunicación oral. Congreso: 39 Congreso de la Sociedad Española de Inmunología

Lugar celebración: Alicante, España. Fecha: 5-7 Mayo del 2016

- Autores: Magdalena Molero-Abraham, Esther M. Lafuente, Miguel Fernandez-Arquero, Miguel Casanovas, Enrique Fernandez-Caldas, José L. Subiza and Pedro Reche

Título: Identification of HRV-specific promiscuous CD8 T cell epitopes

Tipo de participación: Presentación Oral por Premio Congreso: V Jornada SICAM

Lugar celebración: Madrid, España Fecha: 12 de Diciembre del 2014

Galardonado con el PREMIO CARMEN VELA

- Autores: Álvaro Torres, Sara Robles, Magdalena Molero, Iria Medraño, Pedro Reche, Carlos Cabañas, Esther Lafuente

Título: Role of RIAM in Complement Receptor CR3/ α M β 2 Activation and Signaling

ANEXOS

Tipo de participación: Poster Congreso: V Jornada SICAM

Lugar celebración: Madrid, España Fecha: 12 de Diciembre del 2014

-Autores: M^a Magdalena Molero, Alba C. Pérez-Escobar, Esther M. Lafuente, Miguel Fernández-Arquero, Miguel Casanovas, Enrique Fernández-Caldas, José L. Subiza and Pedro Reche

Título: Screening human rhinoviruses for conserved and promiscuous CD8 T cell epitopes

Tipo de participación: Poster Congreso: 38 Congreso Nacional de Inmunología

Lugar celebración: Badajoz, Spain Fecha: 8-10 de Mayo del 2014

-Autores: Magdalena Molero-Abraham, Esther L Lafuente and Pedro Reche

Título: EPISOPT: A tool for optimal T cell epitope selection and vaccine design

Tipo de participación: Oral Congreso: The 3rd ISV Pre-conference Computational Vaccinology Workshop (ICoVax 2013)

Lugar celebración: Barcelona, Spain Fecha: October 26th, 2013

- Autores: M^a Magdalena Molero, Diego Franco, Amelia Aránega, Jorge N Domínguez

Título: Localization and cell-lineage analysis of the embryonic “pacemaker” precursor cells during early mouse development

Tipo de participación: poster Congreso: CNIC conference “Cardiovascular Development, Disease and repair”

Lugar celebración: Madrid, España Fecha: 8-9/11/2013

- Autores: M^a Magdalena Molero, Diego Franco, Amelia Aránega, Jorge N Domínguez

Título: Localization and cell-lineage analysis of the embrionic “pacemaker” precursor cells during early mouse development

Tipo de participación: Poster Congreso: Berlin Cardiovascular Development Meeting.

Lugar celebración: Berlin, Germany Fecha: September 26-28, 2013

- Autores: M^a Magdalena Molero, Diego Franco, Amelia Aránega, Jorge N Domínguez

Título: Cell lineage analysis and localization of the embryonic sinoatrial node precursor cells during early mouse development

Tipo de participación: poster Congreso: 17th International Congress of Developmental Biology

Lugar celebración: Cancun, Mexico Fecha: June 16th-20th, 2013

-Autores: M^a Magdalena Molero, Diego Franco, Amelia Aránega, Jorge N Domínguez

Título: Cell lineage analysis and localization of the sinoatrial node precursor cells within the posterior secondary heart field in the mouse

Tipo de participación: poster Congreso: IX Meeting of the Spanish society for Developmental Biology

Lugar celebración: Granada, España Fecha: November 12-14, 2012

-Autores: M^a Magdalena Molero, Diego Franco, Amelia Aránega, Jorge N Domínguez

Título: Localization and lineage analysis of the sinoatrial node precursor cells within the posterior Secondary Heart Field in the mouse

Tipo de participación: poster Congreso: Weinstein Cardiovascular Development Conference

Lugar celebración: Chicago, IL USA Fecha: 2-4 May 2012

- Autores: Alexandre Francou, Jorge N. Domínguez, Magdalena Molero, Edouard Saint-Michel, Karim Mesbah, Robert G. Kelly

Título: Properties of the murine second heart field

Tipo de participación: Oral Congreso: ANNUAL MEETING OF THE WORKING GROUP ON DEVELOPMENTAL ANATOMY AND PATHOLOGY

Lugar celebración: Liblice, Czech Republic Fecha: 22-25/09/2011

Premios

Premio Carmen Vela por la comunicación “Identification of HRV-specific promiscuous CD8 T cell epitopes” concedido por la Sociedad de Inmunología de la Comunidad de Madrid (SICAM) en la V Jornada Científica de la SICAM celebrada el 12 de diciembre de 2014 en el Hospital Universitario 12 de Octubre en Madrid.

Participación en proyectos

-Desarrollo asistido por computadora de vacunas de epitopos: aplicación al Rhinovirus humano. Ministerio de Economía y Competitividad (REF: BIO2014-54164-R). Investigador principal Pedro Reche.

- Identificación de parámetros de inducción de tolerancia inmunitaria en el tratamiento de la alergia a ácaros y gramíneas con nuevas vacunas de conjugados. Inmunotek SL. Investigadores: Pedro A Reche y Oscar Palomares

-Desarrollo de fármacos inmunoestimulantes de origen bacteriano para la prevención de infecciones respiratorias recurrentes en niños y en adultos. Ministerio de Economía y Competitividad (REF: IPT-2012- 0639-090000). Investigadores: Pedro A Reche y Oscar Palomares

- Estimulación pan-poblacional de la respuesta de los linfocitos T frente a epítomos CD8 conservados del virus de la hepatitis C. Ministerio de Innovación y Ciencia. (REF: SAF2009-08103). Investigador principal Pedro Reche.

Estancias

Estancia de 3 meses (desde el 03/09/2014 hasta 11/11/2014) en el Hospital Universitari i Politecnic La Fe de Valencia llevando a cabo parte del proyecto “Desarrollo de un fármaco inmunoestimulante de origen bacteriano para la prevención de infecciones respiratorias recurrentes en niños y en adultos”, bajo la supervisión del Dr Antonio Nieto García.

Becas y contratos

-Contrato a cargo del proyecto “Identificación de parámetros de inducción de tolerancia inmunitaria en el tratamiento de la alergia a ácaros y gramíneas con nuevas vacunas de conjugados” en la facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Del 01/02/2015 hasta la actualidad

-Contrato a cargo del proyecto “Desarrollo de fármacos inmunoestimulantes de origen bacteriano para la prevención de infecciones respiratorias recurrentes en niños y adultos” en la facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Del 15/04/2013 al 31/12/2014.

-Contrato a cargo del proyecto “Estimulación pan-poblacional de la respuesta de los linfocitos T frente a epítomos conservados” en la facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Del 25/02/2013 al 14/04/2013.

-Beneficiaria de una Beca de Apoyo a la Investigación, colaborando en el proyecto de investigación “Bases moleculares del papel de Pitx2 en arritmias cardíacas”, en el departamento de Biología Experi-

ANEXOS

mental de la Universidad de Jaén. 15/09/2011 al 14/12/2011.

-Beneficiaria de una Beca de Iniciación a la Investigación (Plan de Apoyo a la Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación de la Universidad de Jaén). Curso 2010-2011. Equivalente a la beca de colaboración del Ministerio

Otros méritos

Docencia:

Prácticas de Inmunología de 1º de Medicina (curso 2012/2013) Horas: 1.6

Prácticas de Inmunología de 5º de Farmacia (curso 2013/2014) Horas: 1.2

Prácticas de Inmunología de 1º de Medicina (curso 2013/2014) Horas: 1.6

Prácticas de Inmunología de 1º de Medicina (curso 2014/2015) Horas: 1.6

Prácticas de Inmunología de 1º de Medicina (curso 2015/2016) Horas: 1.6

-Participación en el grupo de investigación Inmunobiología linfocitaria del instituto de investigación del hospital 12 de octubre Investigador Responsable: José Ramón Regueiro González-Barros. Área: Enfermedades inflamatorias y trastornos inmunitarios. Servicio/Unidad: Departamento de Microbiología I/Área: Inmunología. Centro: UCM

-Curso experimentación animal categoría B.

PUBLICACIONES

Hindawi Publishing Corporation
Journal of Immunology Research
Volume 2015, Article ID 738020, 11 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/738020>

Research Article

EPIPOX: Immunoinformatic Characterization of the Shared T-Cell Epitome between Variola Virus and Related Pathogenic Orthopoxviruses

Magdalena Molero-Abraham,¹ John-Paul Glutting,¹ Darren R. Flower,²
Esther M. Lafuente,¹ and Pedro A. Reche¹

¹School of Medicine, Unit of Immunology, Complutense University of Madrid, Pza. Ramón y Cajal, s/n, 28040 Madrid, Spain

²School of Life and Health Sciences, University of Aston, Aston Triangle, Birmingham B4 7ET, UK

Correspondence should be addressed to Pedro A. Reche; parecheg@med.ucm.es

Received 26 June 2015; Revised 8 September 2015; Accepted 1 October 2015

Academic Editor: Jacek Tabarkiewicz

Copyright © 2015 Magdalena Molero-Abraham et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Concerns that variola viruses might be used as bioweapons have renewed the interest in developing new and safer smallpox vaccines. Variola virus genomes are now widely available, allowing computational characterization of the entire T-cell epitome and the use of such information to develop safe and yet effective vaccines. To this end, we identified 124 proteins shared between various species of pathogenic orthopoxviruses including variola minor and major, monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses, and we targeted them for T-cell epitope prediction. We recognized 8,106, and 8,483 unique class I and class II MHC-restricted T-cell epitopes that are shared by all mentioned orthopoxviruses. Subsequently, we developed an immunological resource, EPIPOX, upon the predicted T-cell epitome. EPIPOX is freely available online and it has been designed to facilitate reverse vaccinology. Thus, EPIPOX includes key epitope-focused protein annotations: time point expression, presence of leader and transmembrane signals, and known location on outer membrane structures of the infective viruses. These features can be used to select specific T-cell epitopes suitable for experimental validation restricted by single MHC alleles, as combinations thereof, or by MHC supertypes.

1. Introduction

Smallpox was a devastating contagious disease that ravaged humankind for millennia, wiping out entire civilizations [1]. The disease was caused by two types of variola virus (VARV), major and minor, which differed greatly in their average mortality rates: 30% versus 1%, respectively. VARV major was the most prevalent form [2, 3]. Systematic vaccination against smallpox began in the early 19th century but the disease lingered until the World Health Organization (WHO) initiated worldwide vaccination campaigns in 1967. The last case was reported in Somalia in 1977 and in May 1980 the WHO declared that smallpox had been eradicated, ceasing vaccination [1, 2]. Eradication was facilitated because there are no animal reservoirs for the virus, as it only infects humans [4].

VARV belongs to the *Orthopox* genus of the *Poxviridae* family, consisting of large double-stranded DNA viruses that

replicate in the cytoplasm of infected cells [5, 6]. Poxviruses are large and complex with ~250 genes and a multistage life cycle, producing different infective forms including intracellular mature virions (IMV) and extracellular enveloped virus (EEV) [5, 6]. Humans can be infected by several poxviruses; the closest to VARV that are also pathogenic to humans are vaccinia (VACV), cowpox (CPXV), and monkeypox (MPXV) viruses [7, 8]. The primary reservoir of MPXV is rodents [9], while CPXV has the broadest animal reservoir range of all poxvirus, including cats, dogs, elephants, and rodents [10]. Historically, VAVC has been considered to emerge after repeated passages from an ancestral CPXV [11]. However, phylogenetic studies question that view and there are some speculations that VACV could be a horsepox virus (HPXV) [12]; yet both, the host and origin of VACV, remain unknown [13]. VACV and CPXV infections in humans are generally mild and self-limiting and can induce cross-protective

immunity [14]. The observation that CPXV sufferers did not get smallpox led Edward Jenner in 1798 to introduce a method of vaccination through scarifications with *Variolae vaccinae*, Latin, for CPXV [15]. Immunization with CPXV was eventually displaced by VACV vaccine, which was used subsequently for global smallpox vaccination [12].

As smallpox was eradicated and vaccination ceased, the global population has become increasingly susceptible to both smallpox and zoonosis by orthopoxviruses [8, 9]. People under 30 have no immunity against these viruses and VACV-induced immunity is waning in those that were vaccinated [16]. Despite recommendations by the WHO, stockpiles of smallpox virus had never been destroyed and there are concerns that unregistered stocks could be used as a weapon of bioterrorism [17]. Several features make smallpox a major terrorist threat. It replicates easily, is aerosolizable, and is highly contagious before, during, and after disease onset. Moreover, smallpox is lethal and disfiguring and has already been used as a biological weapon in North America during the French and Indian Wars [18]. Thus, there is renewed interest in the development of vaccines against smallpox, particularly safer ones, since immunization with VACV can result in serious adverse events and it is considered risky in immunocompromised or immune-suppressed individuals [19].

Immune protection against orthopoxviruses requires both B and T cells [20] but the relevance of T cells is paramount. CD8 T cells are required to eliminate infected cells, while help by CD4 T cells is essential to elicit effective humoral responses [21]. Thus, people with dysfunctional humoral responses (e.g., agammaglobulinemia) can be vaccinated with VACV, while those with loss of T cells cannot as they can suffer severe disease [22]. T-cell immune responses are triggered by the recognition of foreign peptides bound to cell surface-expressed major histocompatibility complex (MHC) molecules, also known as human leukocyte antigens, HLA, in humans. CD4 T cells recognize peptides presented by MHC class II (MHC II) molecules while CD8 T cells recognize peptides presented by MHC class I (MHC I) molecules.

Advances in both immunology and genomic analysis offer new possibilities for eliciting immune protection without the requirement for live-virus vaccination and attendant complications. The identification of HLA class I and class II restricted T-cell epitopes (CD8 and CD4 T-cell epitopes, resp.) from poxviruses may allow us to develop safe and yet immunogenic peptide-based vaccines. Here, we describe the identification of protein antigens that are shared between several pathogenic orthopoxviruses, including VARV, MPXV, CPXV, and VACV, and T-cell epitopes that are identical in all selected proteins. This information was used to create a freely accessible web resource, EPIPOX: URL <http://imed.med.ucm.es/epipox/>, intended to facilitate the design of epitope-based vaccines against orthopoxviruses.

2. Materials and Methods

2.1. Orthopoxvirus Sequences and Experimentally Defined T-Cell Epitopes. In this study, we used the entire proteomes of 8 orthopoxviruses: VARV major, strain Bangladesh-1975,

TABLE 1: Orthopoxviruses used in this study.

Virus	Strain	ACC	Genes
VARV major	Bangladesh-1975	L22579	189
VARV major	India-1967	NC_00161	197
VARV minor	Garcia-1966	Y16780	206
MPXV	Zaire-96-I-16	NC_003310	191
CPXV	Brighton Red	AF482758	218
VACV	Copenhagen	M35027	262
VACV	Tian Tan	AF095689	243
VACV	Ankara*	U94848	157

*Modified strain that has lost the ability to replicate; VARV: variola virus; MPXV: monkeypox virus; CPXV: cowpox virus; VACV: vaccinia virus.

GenBank Accession: GB: L22579; VARV major, strain India-1967, GB: NC.00161; Variola major minor, strain Garcia-1966, GB: Y16780; Monkeypox virus, strain Zaire-96-I-16, GB: NC.003310; Cowpox virus strain, strain Brighton Red, GB: AF482758, Vaccinia virus, strain Copenhagen, GB: M35027; Vaccinia virus, strain Tian Tan, GB: AF095689; Vaccinia virus, strain Ankara, GB: U94848. The proteomes were obtained from the various translation features of the relevant GenBank genomic records using BIOPERL [23] (Table 1).

We also used experimentally defined poxvirus-specific HLA I and HLA II-restricted T-cell epitopes that were retrieved from the IEDB [24] and EPIMHC [25] databases. We only considered unique T-cell epitope sequences with a size of 9 amino acids that were reported to be identified in humans infected with orthopoxviruses or who were vaccinated. We provide a list of experimentally defined T-cell epitopes as supplementary material in Additional File S1 in Supplementary Material available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2015/738020>.

2.2. Protein Sequence Analyses and Annotations. We took VARV major, strain Bangladesh-1975, as the reference for subsequent sequence analyses. We identified proteins with leader signals using SIGNALP [26] and transmembrane regions using TMHMM [27]. We identified protein orthologs using BLAST [27]. Briefly, we first BLAST the reference proteins against formatted databases of each of the remaining orthopoxvirus proteomes. We performed BLAST searches with default settings and considered only the description of the first hit and the corresponding alignment. Subsequently, we selected those protein searches that gave hits in each of the proteomes with identities greater than 60% and identified the corresponding orthologs. We used BIOPERL to parse BLAST hits [23].

Information on the temporal expression of VACV genes was kindly provided by Dr. Lefkowitz from the Poxvirus Bioinformatics Resource Center [28]. The information consisted on annotations identifying those genes that are expressed early (E), intermediate (I), and late (L) during the life cycle of VACV. This information is provided as supplementary material in Additional File S2. In addition, we identified, from the data provided by Dr. Lefkowitz, gene products associated with the outer membranes of VACV IMV

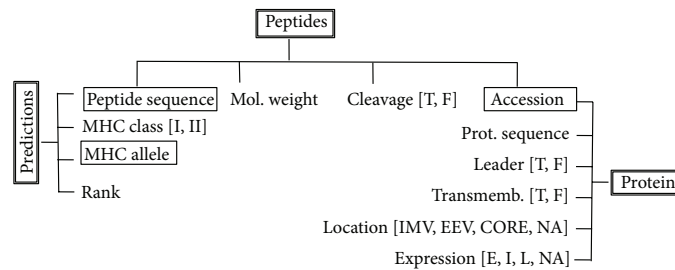


FIGURE 1: EPIPOX database structure. EPIPOX is a relational database consisting of three main tables: *peptides*, *predictions*, and *proteins*. Table names are boxed with double lines. For each table, we show their fields and boxed with single lines the fields that work as table keys. For fields taking discrete nominal values, we show them between square brackets.

and EEV infective forms, as well as those proteins that are part of the VACV virion or CORE. This information is also included as supplementary material in Additional File S2. Protein annotations obtained for VACV were transferred to protein orthologs.

2.3. Prediction of T-Cell Epitopes. We predicted MHC I and MHC II peptide binding to anticipate potential CD8 and CD4 T-cell epitopes, respectively. Specifically, we predicted peptide-MHC binding from VARV Bangladesh proteins that are shared between all selected orthopoxviruses using 32 HLA I- and 33 HLA II-allele specific position-specific scoring matrices (PSSMs) [29–31]. For a given protein, we considered the top 2% and 4% of scoring peptides to constitute HLA I- and HLA II-binding peptides, respectively. We only predicted binding for peptides of nine residues; most HLA I-restricted peptides are 9 residues in length and while HLA II-restricted peptides vary in length (9–22 amino acids) they have a core of 9 residues that anchor the peptide in the binding groove of HLA II molecules [30, 32]. We also used N-gram language models to identify whether peptides can be generated from the source antigen by proteasomal cleavage [33]. This information is only relevant to HLA I-binding peptides, since most peptides presented by MHC I are derived from antigens degraded by the proteasome [34].

2.4. Database Building and Web Server Implementation. Predicted T-cell epitopes and obtained protein annotations were incorporated into a POSTGRES relational database. The database consists of 3 tables (*peptides*, *predictions*, and *proteins*) that are linked through unique keys (Figure 1). Briefly, table *predictions* contains peptide sequences and their MHC restriction elements; table *peptides* includes the peptide molecular weight, its protein accession number, and whether the peptide is cleaved by the proteasome; and table *proteins* contains gene product information including temporal expression (E: early, I: intermediate, and L:late), location in the virus (IMV, EEV, and CORE), and the existence of leader and transmembrane regions. We also developed a web front end or GUI to allow ready access to EPIPOX. Behind the interface is a Python script that handles database queries through underlying SQL. The EPIPOX resource is

implemented on an Apache Web server under the Mac OSX operating system.

3. Results and Discussion

3.1. Epitope-Vaccine Design against Orthopoxviruses. T-cell adaptive immunity is required for clearance of poxviruses during infection and/or vaccination and can also contribute to protective immunity from subsequent exposures [35, 36]. Moreover, peptides corresponding to VACV-specific CD8 T-cell epitopes can confer protection to mice subjected to lethal VACV challenges [37]. Fueled by the need to develop safer smallpox vaccines, such knowledge has led to the recent identification of many VACV-specific T-cell epitopes [37, 38]. These T-cell epitopes are deposited haphazardly in various specialized databases, including IEDB [24], EPIMHC [25], TEPIDAS [39], and AntiJen [40]. Of relevance for epitope-vaccine design, CD8 T-cells target primarily early and nonstructural gene products [41, 42]. CD4 T cells target late and the most abundant genes products (IMV and EEV membrane proteins and CORE proteins), as do antibodies [42, 43]. While some of the identified VAVC-specific T-cell epitopes are conserved in VARV a rational approach to identifying all potential T-cell epitopes eliciting cross-protective immunity is still required.

3.2. Shared Orthopoxvirus Proteins for Cross-Protective Immunity. Nearly all orthopoxviruses can protect against challenge with another orthopoxvirus [14]. This exquisite cross-protective immunity is likely a result of direct antigenic similarity between poxviruses. Therefore, prior to defining potential T-cell epitopes we identified shared antigens between pathogenic orthopoxviruses. Identification of shared antigens is also relevant to reducing the experimental burden associated with T-cell identification. Human pathogen orthopoxviruses have large genomes encompassing over 180 open reading frames (ORF) with the exception of VACV Ankara strain, which has only 157 genes and lacks the ability to replicate [44] (Table 1). Using VARV major, strain Bangladesh-1975, as a reference, we identified 124 ORFs that are shared between 8 different complete genomes from several orthopoxviruses, including VARV minor, CPXV, MPXV, and several VACV strains (Additional File S3). Despite the

TABLE 2: Orthopoxvirus proteins contributing to cross-protective immunity.

VACC: GI ORF	VARV: GI ORF	MPXV: GI ORF	CPXV: GI ORF	LOC ¹ /EXP ² /TM ³ /LD ⁴
335424 LIR	438991 MIR	17974993 MIR	20153082 V099	IMV/late/yes/no
335455 D8L	439016 F8L	17975018 E8L	20153106 V119	IMV/late/yes/no
335500 A27L	439052 A31L	17975052 A29L	20153143 V156	IMV/late/no/no
335508 A33R	439057 A36R	17975058 A35R	20153149 V162	EEV/early/yes/no
335549 B5R	439084 B6R	17975080 B6R	20153177 V190	EEV/#/yes/yes
335438 H3L	439004 I3L	17975006 H3L	20153094 V107	IMV/late/yes/no
335477 A10L	439032 A11L	17975034 A11L	20153122 V135	CORE/#/no/no
335341 C7L	438926 D11L	17974926 D10L	20153015 V028	U/early/no/no

Table shows GenBank identification numbers (GI) and open reading frame names (ORF) for VACC (strain Copenhagen), VARV (strain Bangladesh-1975), MPXV (strain Zaire-96-I-16), and CPXV (strain Brighton Red). ¹LOC: location, ²EXP: temporal expression, ³TM: transmembrane, and ⁴LD: leader signal. NS: nonstructural gene. #: information not available. U: unknown. List of proteins was obtained from [45]. Annotations 1, 2, 3, and 4 obtained as indicated elsewhere in Section 2.

criterion for selection being 60% identity, all 124 selected proteins have an average identity $\geq 85\%$ as shown in Additional File S3. These proteins are prime candidates to induce cross-protective immunity although they need to be targeted by the immune system. Interestingly, within the selected proteins there are 8 known immunogens that conferred $>60\%$ protection to VACV in animal models (Table 2) [45]. Six of these immunogens are IMV or EEV proteins carrying transmembrane regions and/or are being late gene products. Interestingly, among the selected 124 proteins we found 26 additional proteins with transmembrane regions that could also be prime vaccine subunits candidates (Table 3). Some of these proteins also have leader signal sequences (Table 3). Viral proteins with leader sequences follow the cell secretory pathway and are thus also important targets to consider for vaccine design [46, 47].

3.3. T-Cell Epitope from Pathogenic Orthopoxvirus Proteins. We targeted the shared orthopoxvirus proteins for T-cell epitopes prediction using 32 and 33 HLA I- and HLA II-specific profile matrices (details in Material and Methods). The alleles targeted for peptide binding prediction are shown in Additional File S4. We selected these alleles because there are experimental peptide-binding data for them, which is required to make accurate peptide-MHC binding predictors [48]. Incidentally, these HLA alleles are frequently expressed in the general population and targeting them for epitope prediction permits the development of epitope-based vaccines covering the entire population. These HLA allelic variants can have overlapping peptide-binding repertoires and can be clustered accordingly in supertypes [49, 50]. Selecting promiscuous peptide-binders to multiple HLA molecules facilitates the development of vaccines with a minimum number of peptides [49–51].

We predicted a total of 18726 HLA I-restricted and 32722 HLA II-restricted orthopoxvirus specific T-cell epitopes, all being identical between all orthopoxviruses considered in this study. In Additional File S4 we provide numbers of T-cell epitopes predicted by each HLA-specific profile used in this study. We predicted more CD4 than CD8 T-cell epitopes because we used a more permissive peptide-binding threshold for MHC II molecules (4% of top scoring peptides)

than for MHC I molecules (2% of top scoring peptides) since peptide-binding prediction to MHC II molecules is considerably less accurate than to MHC I molecules [46]. Interestingly, we identified only 8106 unique HLA I-restricted T-cell epitope sequences and a few more (8483) unique HLA II-restricted T-cell epitope sequences. Therefore, there is a considerable overlap between the peptide binding repertoires of HLA molecules, which is larger for HLA II molecules than for HLA I molecules. HLA I-restricted peptides bound on average to 2.3 distinct HLA I molecules, while HLA II-restricted peptides bound on average to 3.8 distinct HLA II molecules. This is due to the fact that peptide-binding to MHC II molecules is more degenerate than to MHC I molecules [29, 30]. In Additional File S5, we provide all distinct predicted peptides with the HLA molecules that they were predicted to bind. Interestingly, there is also some overlap between HLA I- and HLA II-restricted peptides. In particular, we find that there are 2452 peptides that are predicted to be restricted by both HLA I and HLA II molecules. Thus, in total the predicted T-cell epitome consisted of just 14137 unique sequences among all predicted T-cell epitopes.

We compared the predicted T-cell epitome with experimentally defined poxvirus-specific HLA-restricted T-cell epitopes deposited in the IEDB [24] and EPIMHC [25]. We retrieved 170 HLA I and 9 HLA II-restricted T-cell epitopes meeting our criteria (see Additional File S1) but we only considered for comparison 85 HLA I- and 8 HLA II-restricted T-cell epitopes that we identified here to be conserved in all orthopoxviruses considered in this study. Of those, 72 HLA I- and 6 HLA II-restricted T-cell epitopes were found within our predicted T-cell epitome. Moreover, we predicted the experimentally verified restriction element in $> 80\%$. The experimentally determined and shared epitopes that were not predicted (a minority) either are restricted by noncovered alleles or were simply not predicted. In Table 4, we summarize the data showing the verified and predicted HLA restriction elements. In sum, we readily predicted most of the experimentally verified T-cell epitopes. Considering that on average 10% of predicted T-cell epitopes can be experimentally verified [52], we shall expect that there are many more valid T-cell epitopes remaining to be validated within the T-cell epitome predicted in this study.

TABLE 3: Shared orthopoxvirus proteins with transmembrane and/or leader sequences.

VARV GI ORF	MPXV GI ORF	CPXV GI ORF	VACV GI ORF	IDEN ¹ (%)	TM ²	LEAD ³	EXP ⁴	LOCATION ⁵
GI:439084 B6R	GI:17975080 B6R	GI:20153177 V190	GI:335549 B5R	93.1	Yes	Yes	L	EEV membrane*
GI:439016 F8L	GI:17975018 E8L	GI:20153106 V119	GI:335455 D8L	94.7	Yes	No	L	IMV membrane*
GI:438990 H9R	GI:17974992 G10R	GI:20153081 V094	GI:335423 G9R	98.1	Yes	No	L	U
GI:438919 D4R	GI:17974919 D3R	GI:20153007 V020	GI:335333 C11R	88.8	Yes	Yes	U	U
GI:439085 B7R	GI:17975081 B7R	GI:20153178 V191	GI:335550 B6R	93.1	Yes	No	U	U
GI:439035 A14L	GI:17975037 A14L	GI:20153125 V138	GI:335483 A13L	88.6	Yes	No	L	IMV membrane
GI:438946 C8L	GI:17974949 C10L	GI:20153036 V049	GI:335366 F4L	97.6	Yes	No	E	U
GI:438977 K5L	GI:17974979 I5L	GI:20153068 V081	GI:335409 I5L	94.9	Yes	No	L	IMV membrane
GI:438967 E8R	GI:17974969 F7R	GI:20153058 V071	GI:335395 E8R	97.4	Yes	No	L	U
GI:439004 I3L	GI:17975006 H3L	GI:20153094 V107	GI:335438 H3L	95.8	Yes	No	L	IMV membrane*
GI:439014 F6R	GI:17975016 E6R	GI:20153104 V117	GI:335453 D6R	99.0	Yes	No	L	U
GI:439003 I2R	GI:17975005 H2R	GI:20153093 V106	GI:335437 H2R	99.2	Yes	No	L	U
GI:439056 A35L	GI:17975057 A34L	GI:20153148 V161	GI:335506 A32L	98.1	Yes	No	L	U
GI:439000 L5L	GI:17975002 L5L	GI:20153090 V103	GI:335433 J5L	98.1	Yes	No	L	U
GI:439058 A37R	GI:17975059 A36R	GI:20153150 V163	GI:335509 A34R	98.1	Yes	No	L	EEV membrane
GI:438991 M1R	GI:17974993 M1R	GI:20153082 V095	GI:335424 L1R	99.2	Yes	No	L	IMV membrane*
GI:439057 A36R	GI:17975058 A35R	GI:20153149 V162	GI:335508 A33R	93.0	Yes	No	E	EEV membrane*
GI:438951 C13L	GI:17974954 C15L	GI:20153041 V054	GI:335373 F9L	97.5	Yes	No	L	U
GI:439038 A17L	GI:17975040 A17L	GI:20153129 V142	GI:335486 A16L	97.0	Yes	No	L	U
GI:438974 K2L	GI:17974976 I2L	GI:20153065 V078	GI:335405 I2L	99.3	Yes	No	L	U
GI:439008 I7R	GI:17975010 H7R	GI:20153098 V111	GI:335442 H7R	95.2	Yes	No	L	U
GI:438982 H3L	GI:17974984 G2L	GI:20153073 V086	GI:335414 G3L	95.8	Yes	No	L	U
GI:439042 A22L	GI:17975044 A21L	GI:20153134 V147	GI:335490 A21L	96.9	Yes	No	U	U
GI:439059 A38R	GI:17975061 A38R	GI:20153152 V165	GI:335512 A36R	92.3	Yes	No	E, L	EEV membrane
GI:439031 A10L	GI:17975033 A10L	GI:20153121 V134	GI:335476 A9L	89.0	Yes	Yes	E, L	U
GI:439033 A12R	GI:17975035 A12R	GI:20153123 V136	GI:335481 A11R	98.5	Yes	No	L	U
GI:439036 A15L	GI:17975038 A15L	GI:20153126 V139	GI:335484 A14L	97.8	Yes	No	L	IMV membrane
GI:439067 A46R	GI:17975066 A43R	GI:20153159 V172	GI:335522 A43R	92.3	Yes	Yes	U	U
GI:439039 A18L	GI:17975041 A18L	GI:20153130 V143	GI:335487 A17L	98.0	Yes	No	L	IMV membrane
GI:439077 J7R	GI:17975076 B2R	GI:20153172 V185	GI:335539 A56R	82.1	Yes	Yes	E, L	EEV membrane
GI:439062 A41L	GI:17975063 A40L	GI:20153155 V168	GI:335516 A38L	94.7	Yes	Yes	U	U

Table shows GenBank identification numbers (GI) and open reading frame names (ORF) for VARV: strain Bangladesh-1975, MPXV: strain Zaire-96-I-16, CPXV: strain Brighton Red, and VACV: strain Copenhagen. ¹IDEN: average identity between the selected proteins. ²TM: transmembrane. ³LEAD: leader signal. ⁴EXP: temporal expression (E: early, I: intermediate, and L: late). ⁵LOCATION: location. *Proteins known to induce protective immunity (see Table 2). Annotations were obtained as indicated elsewhere in Section 2. U: information not found.

3.4. EPIPOX Database and Web Server. We developed a relational database based upon the predicted T-cell epitome and a web-based resource to facilitate online access and to query the database. We named this resource EPIPOX and made it available for free public use (URL: <http://imed.med.ucm.es/epipox/>). EPIPOX is a *de facto* analysis pipeline of viral T-cell epitomes. The content of the EPIPOX database is organized in three tables (*peptides*, *predictions*, and *proteins*) (Figure 1). The table *predictions* contains all predicted T-cell epitopes, consisting of 18726 HLA I- and 32722 HLA II-restricted peptides, each identified by its sequence and restriction element. Peptide sequences in this table are not unique as each peptide can bind to numerous HLA I molecules. Peptide sequences are, however, unique in the table *peptides*. This table contains 14137 sequences comprising the whole predicted epitome regardless of the restriction elements. Antigen annotations in EPIPOX are

found within the table *proteins* (Figure 1). We only included annotations that are relevant to epitope vaccine design, such as temporal expression of gene products and location in relevant structures of the virus such as the EEV and IVM membranes and CORE. Early expressed proteins and highly expressed proteins are generally thought to be more immunogenic, particularly with regard to CD8 T cells [53, 54]. On the other hand, highly abundant late proteins that are located in membrane structures of the poxvirus appear to be the main focus of the antibody and CD4 T-cell response [42, 43]. In the table *proteins*, we also provide annotations on whether the proteins have transmembrane region or leader signal sequence, as proteins with these features often interact with host cells and are important targets for subunit vaccine design [46, 47].

The EPIPOX web interface (Figure 2) allows querying of the database combining any annotation field in the database,

TABLE 4: Experimentally identified T-cell epitopes within the shared T-cell epitome predicted from pathogenic orthopoxvirus proteins.

(a)					Predicted HLA I restriction				
CD8 T-cell epitopes	VAR V GI	VAR V ORF	Experimental HLA I restriction		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
ALMRRIAVV	439013	F5R	HLA-A2		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
YLLSLFSTL	439056	A35L	HLA-A2		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
YLLAKLTALV	438985	H5R	HLA-A2		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
NLLCHIVSL	438979	K7L	HLA-A2		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
IVTEAHTV	439072	J2R	HLA-A0201		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
SLSAYIIRV	439004	I3L	HLA-A0201		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
YLDGQLARL	438965	E6R	HLA-A0201		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
YLPVISTTI	438988	H7L	HLA-A0201		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
TYNDHIVNL	439072	J2R	HLA-A2301		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
RPFSTFKPL	439046	A25R	HLA-B7		HLA-B0702	HLA-B3501	HLA-B5101	HLA-B5301	HLA-B5401
ALDEKFLI	439045	A24R	HLA-A0201		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
FPEYGGKVF	438968	E9L	HLA-B0702		HLA-B0702	HLA-B1502	HLA-B3501	HLA-B5101	HLA-B5301
RLYDYFTRV	438973	K1L	HLA-A0201, HLA-A2		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
ILDDNLKYV	438985	H5R	HLA-A0201, HLA-A2		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
LLSVYVVVY	439009	F1R	HLA-A2		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
FLIDLAFLI	438960	E1L	HLA-A2		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
FPRSMLSIF	438994	M4R	HLA-B07:02		HLA-B0702	HLA-B3501	HLA-B4402	HLA-B5301	HLA-B5401
YLFDFVISL	438996	L1R	HLA-A2		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
YL1KLTEPV	439009	F1R	HLA-A0201, HLA-A2		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
SPSNHHILL	439025	A4L	HLA-B07:02		HLA-B0702	HLA-B3501	HLA-B5101	HLA-B5301	HLA-B5401
YPSNKNVEI	439033	A12R	HLA-B07:02		HLA-B0702	HLA-B3501	HLA-B5101	HLA-B5301	HLA-B5401
MLMETWFFI	439007	I6R	HLA-A2		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
ILNPVASSL	438998	L3R	HLA-A2		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
FPSVFINPI	438968	E9L	HLA-B0702		HLA-B0702	HLA-B3501	HLA-B5101	HLA-B5301	HLA-B5401
KYQSPVNIF	439043	A21R	HLA-A24, HLA-class I		HLA-A2301	HLA-A2402	HLA-A2403	HLA-A2405	HLA-A2407
YLFGGFSTL	438980	K8R	HLA-A2		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
YL1YETHLI	438981	H1L	HLA-A2		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
VL1YNGVNYL	439009	F1R	HLA-A2		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
LIQETIVHEV	439029	A8L	HLA-A0201		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
VELGSGNSF	439043	A21R	HLA-B3701		HLA-B1501	HLA-B1502	HLA-B4402	HLA-B5301	HLA-B5401
RMTAISAKV	438934	P1L	HLA-A2		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
FILGIITTV	439036	A15L	HLA-A0201		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
LLSKNTFYL	438981	H1L	HLA-A2		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
RPRDAIRFL	438961	E2L	HLA-B0702		HLA-B0702	HLA-B3501	HLA-B5301	HLA-B5401	HLA-B5401
KLFNKVP1V	438996	L1R	HLA-A2		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
SLFMILCTR	438979	K7L	HLA-A0301, HLA-A1101		HLA-A1101	HLA-A3101	HLA-A3301	HLA-A6801	HLA-A6801
ILNDEQLNL	439029	A8L	HLA-A0201		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
YLLGDSDSV	439038	A17L	HLA-A2		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
QLMYALEPR	438985	H5R	HLA-A0301, HLA-A1101		HLA-A3101	HLA-A3301	HLA-A6801	HLA-A6801	HLA-A6801
LMDENTYAM	439066	A45R	HLA-A2		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
LLLGCGFW	438955	C17L	HLA-A2		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206
LLSHFYPAV	438952	C14L	HLA-A2		HLA-A0201	HLA-A0202	HLA-A0203	HLA-A0205	HLA-A0206

(a) Continued.

CD8 T-cell epitopes	VARV GI	VARV ORF	Experimental HLA I restriction	Predicted HLA I restriction
NLFTFLHEI	439045	A24R	HLA-class I	HLA-A*0201
GLFDVNFV	439070	A49R	HLA-A2, HLA-A*0201	HLA-A*0202
YLGRVCWL	439038	A17L	HLA-A2	HLA-A*0202
ILKSLGFKV	439880	K8R	HLA-A2	HLA-A*0202
DEVASTHDW	439025	A4L	HLA-B4403	HLA-B*4402
FLVIAINAM	439029	A8L	HLA-A2, HLA-A*0201	HLA-A*0206
LSDLKKTLY	439040	A19R	HLA-A1, HLA-class I	HLA-B*5801
LLYFKVFGI	439019	N1L	HLA-A2	HLA-Cw*0304
SSNIMSESY	439014	F6R	HLA-A2	HLA-B*1501
DTRGIFSAY	439032	A11L	HLA-A*0101, HLA-A3002	HLA-A*0205
QIDVEKKIV	439029	A8L	HLA-A26, HLA-class I	HLA-B*5801
YLFRCVDIV	439030	A9R	HLA-A*0201	HLA-A*0207
KIEDLINQL	438973	K1L	HLA-A2	HLA-A*0203
FTIDFKLY	439009	F1R	HLA-A1, HLA-A2601, HLA-A2902	HLA-A*0101
WLKIKRDYL	439074	J4R	HLA-B*0801	HLA-B*0801
AINVEKTEL	473688	I6R	HLA-A*0201	HLA-A*0207
RIFRVVYV	439007	I6R	HLA-A2	HLA-A*0202
SIIDLIDEY	438942	C4R	HLA-B*1501	HLA-A*0203
EERHIFLDY	439009	F1R	HLA-B4403	HLA-B*4402
ILSDENYLL	439028	A7L	HLA-A2, HLA-A*0201	HLA-A*0205
HISALKRRY	439027	A6R	HLA-A*0101, HLA-A2902	HLA-A*0101
FLNISWFYI	438968	E9L	HLA-A2, HLA-A*02:01	HLA-A*0205
SEVKFKYVL	439002	I1L	HLA-B44	HLA-B*4402
KLLLFNVL	438980	K8R	HLA-A2	HLA-A*0203
YIDISDVKV	438973	K1L	HLA-A*0201	HLA-A*0207
WVNNWKF	439013	F5R	HLA-A24, HLA-A2301, HLA-A2402	HLA-Cw*0702
VLPFDIKKL	439014	F6R	HLA-A*0201	HLA-Cw*0102
VETSISDYY	439043	A21R	HLA-B3701	HLA-B*1501
SQIIDISLR	439022	A1L	HLA-A*0301, HLA-A1101	HLA-B*2705
HDVYGVSNF	439045	A24R	HLA-B4403	HLA-B*4402

(b)

CD4 T-cell epitope	VARV GI	VARV ORF	Experimental HLA II restriction	Predicted HLA II restriction
FLIDLAFI	438960	E1L	HLA-class II	DRB1*0311
IHWQIISSE	439072	J2R	DRB1*04:05	DRB1*0401
YIDAYVRL	439021	N3L	DRB1*15:01	DRB1*1304
LMIDENTYAM	439066	A45R	HLA-class II	DRB3*0101
IDAYVSRLL	439021	N3L	DRB1*15:01	DRB1*1304
RMIAISAKV	438934	P1L	HLA-class II	DRB3*0202

T-cell epitopes in this table are a subset of those provided in Additional File S1.

Databases >> Epipox

EPIPOX DATABASE SEARCH

This resource contains potential T cell epitopes from 124 proteins that are shared between pathogenic orthopoxviruses including variola (VARV) major and minor, monkeypox (MPXV), cowpox virus (CPXV) and vaccinia (VACV) viruses. The system uses as reference VARV major, strain Bangladesh-1975

T cell epitopes can be retrieved by distinct criteria, including HLA restriction, temporal expression and several protein features.

SEARCH: SELECT HLA RESTRICTION AND VARV PROTEINS

HLA

AND OR

All Class I

HLA_A0201

HLA_A0202

HLA_A0203

HLA_A0205

HLA_A0206

HLA_A0207

HLA_A0301

HLA_A1

HLA_A1101

HLA_A2301

HLA_A2402

HLA_A2403

HLA_A2405

Protein

All

439072|J2R

439041|A20L

438962|E3L

438944|C6L

438941|C3L

438927|D12L

439016|F8L

473688|L6R

438981|H1L

439067|A46R

439070|A49R

439044|A23R

438920|D5L

Supertypes

☐ A2: (A*0201 A*0202 A*0203 A*0205 A*0206)

☐ A3: (A*3301, A*1101, A*3101, A*0301, A*6801)

☐ B7: (B*5301, B*3501, B*0702, B*5401, B*5101)

LIMIT SEARCH RESULTS

SEQ:

LEADER:

All

TRANS:

All

EXPRESS:

All

E: Early

I: Intermediate

L: Late

LOCATION:

All

CORE

IMV

EEV

PCT OPT:

All

CLEAVED:

All

Reset

Search

FIGURE 2: EPIPOX input page. The input page of EPIPOX is divided in two main sections for intuitive use. In the first part (SEARCH), users select HLA molecules and proteins to retrieve T-cell epitopes (multiple selection is allowed) while in the second part the user can limit the search output according to various criteria. These criteria include temporal expression of gene products (E: early; I: intermediate; L: late), location of proteins in relevant structures of the virus (CORE, IMV, and EEV), and the presence of leader and transmembrane regions. In addition, users can select only those peptides with a relative score above some selectable value. HLA-specific profiles used to score T-cell epitopes can reach a maximum score, which is used to set the relative score in percentage of each peptide. For HLA I-restricted epitopes, users can also restrict the search to those epitopes potentially generated by the proteasome.

as described above. For intuitive use, the interface is divided in two main sections. In the first section (SEARCH), users select proteins and restriction elements for epitope retrieval. In this section, EPIPOX also provides the option to query the database for promiscuous T-cell epitopes binding to three HLA I supertypes (A2, A3, and B7). The alleles belonging to these supertypes are present in 88% of the population regardless of their ethnic groups. Selecting promiscuous peptides restricted by these 3 supertypes facilitates maximizing the population coverage of vaccines with minimum numbers of peptides [49, 50, 55]. In the second section (LIMIT), users can select annotation criteria to restrict the results.

As an example, in Figure 3, we show the page resulting from a sample query consisting of promiscuous peptides from CORE binding to the A2 supertype. From the EPIPOX output, users can also access additional information available from the Virus Pathogen Resource database (Figure 3) [56]. EPIPOX is related somewhat to certain existing databases. On the one hand, it shares features with generic epitope databases such as EPIMHC [25], AntiJen [40], and IEDB [24] and on the other hand it shares features with poxvirus genome annotation-orientated databases such as the *Poxviridae* database [28] (no longer operating) and the Virus Pathogen Resource (<http://www.viprbrc.org/>) [56].

156

FIGURE 3: EPIPOX result page. The figure shows a slice of the output resulting from promiscuous CORE protein peptides binding to the A2 supertype. The output consists of a tabulated list, with information on each of the fields of the search query (columns). From field *SOURCE NAME* (1), users can access proteins from the Virus Pathogen Database (<http://www.viprbrc.org/>) (1) and by clicking on the epitope sequence, field *SEQ* (2), users will get the amino acid sequence of the protein showing the peptide in bold (2).

We expect that this work and EPIPOX will be instrumental in developing safer smallpox vaccines and thereby in preventing zoonosis caused by other orthopoxviruses, including MPXV, which is also a potential terrorist bioweapon. In the future, we plan to enhance EPIPOX with validated and/or experimentally determined epitopes, upgrade protein annotations with functional information, and include additional features such as TAP transport [57], ERAAP cleavage [58], and T-cell epitope immunodominance. In sum, we would expect EPIPOX to establish itself as a facilitating resource of true utility in *inter alia* immunoinformatic characterization of viral genomics and computational reverse vaccinology.

Conflict of Interests

The availability of the VARV genomes enables the use of predictive tools that reveal entire T-cell epitomes and facilitate the development of epitope-based vaccines. However, large and complex viruses, such as VARV, the potential T-cell epitome can be so sizeable that it will challenge experimental validation. Therefore, in this work we applied a rational strategy to limit the list of potential T-cell epitopes. First, we reduced the number of antigens by half by simply selecting those that are conserved among pathogenic orthopoxviruses related to VARV. Second, we enriched the antigens with annotations such as temporal expression and location. Lastly, we created a resource and *de facto* analysis pipeline (EPIPOX) with which to interrogate the resulting T-cell epitome and enable users to select immunologically relevant subsets of T-cell epitopes suitable for experimental validation.

The authors want to specially thank Dr. Ellis L Reinherz for his continuous support, inspiration, and future collaborative work. The authors also wish to thank *Immunotek, SL*, for financial support of MMA, and the Spanish Department of Science at MINECO for supporting the group's research through Grants SAF2006:07879, SAF2009:08301, and BIO2014:54164-R to Pedro A. Reche. Finally, The authors

wish to acknowledge Hong Zhang for programming assistance.

References

- [1] D. R. Hopkins, *The Greatest Killer: Smallpox in History, with a New Introduction*, University of Chicago Press, Chicago, Ill, USA, 2002.
- [2] F. Fenner, R. Wittek, and K. Dumbell, *The Orthopoxviruses*, Academic Press, San Diego, Calif, USA, 1998.
- [3] R. M. L. Buller and G. J. Palumbo, "Poxvirus pathogenesis," *Microbiological Reviews*, vol. 55, no. 1, pp. 80–122, 1991.
- [4] D. Baxby, "Poxvirus hosts and reservoirs. Brief review," *Archives of Virology*, vol. 55, no. 3, pp. 169–179, 1977.
- [5] B. Moss, "Poxviridae. The virus and their replication," in *Fields Virology*, B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds., pp. 2849–2883, Lippincott-Raven Publishers, Hagerstown, Md, USA, 2001.
- [6] K. L. Roberts and G. L. Smith, "Vaccinia virus morphogenesis and dissemination," *Trends in Microbiology*, vol. 16, no. 10, pp. 472–479, 2008.
- [7] I. V. Babkin and I. N. Babkina, "The origin of the variola virus," *Viruses*, vol. 7, no. 3, pp. 1100–1112, 2015.
- [8] S. N. Shchelkunov, S. S. Marennikova, and R. W. Moyer, *Orthopoxviruses Pathogenic for Humans*, Springer, Berlin, Germany, 2005.
- [9] S. Parker, A. Nuara, R. M. L. Buller, and D. A. Schultz, "Human monkeypox: an emerging zoonotic disease," *Future Microbiology*, vol. 2, no. 1, pp. 17–34, 2007.
- [10] G. McFadden, "Poxvirus tropism," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 3, no. 3, pp. 201–213, 2005.
- [11] D. A. Henderson and B. Moss, "Smallpox and vaccinia," in *Vaccines*, S. A. Plotkin and W. A. Orenstein, Eds., W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pa, USA, 1999.
- [12] L. Sánchez-Sampedro, B. Perdiguero, E. Mejías-Pérez, J. García-Arriaza, M. Di Pilato, and M. Esteban, "The evolution of poxvirus vaccines," *Viruses*, vol. 7, no. 4, pp. 1726–1803, 2015.
- [13] E. R. Tulman, G. Delhon, C. L. Afonso et al., "Genome of horsepox virus," *Journal of Virology*, vol. 80, no. 18, pp. 9244–9258, 2006.
- [14] B. L. Jacobs, J. O. Langland, K. V. Kibler et al., "Vaccinia virus vaccines: past, present and future," *Antiviral Research*, vol. 84, no. 1, pp. 1–13, 2009.
- [15] E. Jenner, *An Inquiry into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae: A Disease Discovered in Some of the Western Counties of England, Particularly Gloucestershire, and Known by the Name of the Cow Pox*, Sampson Low, London, UK, 1798.
- [16] H. Nishiura and M. Eichner, "Estimation of the duration of vaccine-induced residual protection against severe and fatal smallpox based on secondary vaccination failure," *Infection*, vol. 34, no. 5, pp. 241–246, 2006.
- [17] D. A. Henderson, T. V. Inglesby, J. G. Bartlett et al., "Smallpox as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense," *The Journal of the American Medical Association*, vol. 281, no. 22, pp. 2127–2137, 1999.
- [18] E. A. Fenn, "Biological warfare in eighteenth-century North America: beyond Jeffery Amherst," *Journal of American History*, vol. 86, no. 4, pp. 1552–1580, 2000.
- [19] D. M. Maurer, B. Harrington, and J. M. Lane, "Smallpox vaccine: contraindications, administration, and adverse reactions," *American Family Physician*, vol. 68, no. 5, pp. 889–896, 2003.
- [20] R. B. Kennedy, I. G. Ovsyannikova, R. M. Jacobson, and G. A. Poland, "The immunology of smallpox vaccines," *Current Opinion in Immunology*, vol. 21, no. 3, pp. 314–320, 2009.
- [21] G. Chaudhri, V. Tahiliani, P. Eldi, and G. Karupiah, "Vaccine-induced protection against orthopoxvirus infection is mediated through the combined functions of CD4 T cell-dependent antibody and CD8 T cell responses," *Journal of Virology*, vol. 89, no. 3, pp. 1889–1899, 2015.
- [22] M. Bray and M. E. Wright, "Progressive vaccinia," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 36, no. 6, pp. 766–774, 2003.
- [23] J. E. Stajich, D. Block, K. Boulez et al., "The Bioperl toolkit: perl modules for the life sciences," *Genome Research*, vol. 12, no. 10, pp. 1611–1618, 2002.
- [24] R. Vita, J. A. Overton, J. A. Greenbaum et al., "The immune epitope database (IEDB) 3.0," *Nucleic Acids Research*, vol. 43, no. 1, pp. D405–D412, 2015.
- [25] P. A. Reche, H. Zhang, J.-P. Glutting, and E. L. Reinherz, "EPIMHC: a curated database of MHC-binding peptides for customized computational vaccinology," *Bioinformatics*, vol. 21, no. 9, pp. 2140–2141, 2005.
- [26] J. D. Bendtsen, H. Nielsen, G. von Heijne, and S. Brunak, "Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0," *Journal of Molecular Biology*, vol. 340, no. 4, pp. 783–795, 2004.
- [27] E. L. Sonnhammer, G. von Heijne, and A. Krogh, "A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences," in *Proceedings of the International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB '98)*, vol. 6, pp. 175–182, Montreal, Canada, June-July 1998.
- [28] E. J. Lefkowitz, C. Upton, S. S. Changayil, C. Buck, P. Traktman, and R. M. L. Buller, "Poxvirus Bioinformatics Resource Center: a comprehensive Poxviridae informational and analytical resource," *Nucleic Acids Research*, vol. 33, pp. D311–D316, 2005.
- [29] P. A. Reche, J.-P. Glutting, and E. L. Reinherz, "Prediction of MHC class I binding peptides using profile motifs," *Human Immunology*, vol. 63, no. 9, pp. 701–709, 2002.
- [30] P. A. Reche, J.-P. Glutting, H. Zhang, and E. L. Reinherz, "Enhancement to the RANKPEP resource for the prediction of peptide binding to MHC molecules using profiles," *Immunogenetics*, vol. 56, no. 6, pp. 405–419, 2004.
- [31] P. A. Reche and E. L. Reinherz, "Prediction of peptide-MHC binding using profiles," *Methods in Molecular Biology*, vol. 409, pp. 185–200, 2007.
- [32] P. A. Reche and E. L. Reinherz, "Sequence variability analysis of human class I and class II MHC molecules: functional and structural correlates of amino acid polymorphisms," *Journal of Molecular Biology*, vol. 331, no. 3, pp. 623–641, 2003.
- [33] C. M. Diez-Rivero, E. M. Lafuente, and P. A. Reche, "Computational analysis and modeling of cleavage by the immunoproteasome and the constitutive proteasome," *BMC Bioinformatics*, vol. 11, article 479, 2010.
- [34] J. S. Blum, P. A. Wearsch, and P. Cresswell, "Pathways of antigen processing," *Annual Review of Immunology*, vol. 31, no. 1, pp. 443–473, 2013.
- [35] W. E. Demkowicz Jr., R. A. Littaua, J. Wang, and F. A. Ennis, "Human cytotoxic T-cell memory: long-lived responses to vaccinia virus," *Journal of Virology*, vol. 70, no. 4, pp. 2627–2631, 1996.

- [36] B. Moss, "Smallpox vaccines: targets of protective immunity," *Immunological Reviews*, vol. 239, no. 1, pp. 8–26, 2011.
- [37] M. Moutaftsi, S. Salek-Ardakani, M. Croft et al., "Correlates of protection efficacy induced by vaccinia virus-specific CD8⁺ T-cell epitopes in the murine intranasal challenge model," *European Journal of Immunology*, vol. 39, no. 3, pp. 717–722, 2009.
- [38] W. Kastenmuller, I. Drexler, H. Ludwig et al., "Infection of human dendritic cells with recombinant vaccinia virus MVA reveals general persistence of viral early transcription but distinct maturation-dependent cytopathogenicity," *Virology*, vol. 350, no. 2, pp. 276–288, 2006.
- [39] C. M. Diez-Rivero, M. Garcia-Boronat, and P. A. Reche, "Integrating T-cell epitope annotations with sequence and structural information using DAS," *Bioinformatics*, vol. 3, no. 4, pp. 156–158, 2008.
- [40] C. P. Toseland, D. J. Clayton, H. McSparron et al., "Antifjen: a quantitative immunology database integrating functional, thermodynamic, kinetic, biophysical, and cellular data," *Immunome Research*, vol. 1, no. 1, article 4, 2005.
- [41] C. Oseroff, F. Kos, H.-H. Bui et al., "HLA class I-restricted responses to vaccinia recognize a broad array of proteins mainly involved in virulence and viral gene regulation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 39, pp. 13980–13985, 2005.
- [42] C. L. Smith, F. Mirza, V. Pasquetto et al., "Immunodominance of poxviral-specific CTL in a human trial of recombinant-modified vaccinia Ankara," *The Journal of Immunology*, vol. 175, no. 12, pp. 8431–8437, 2005.
- [43] L. Jing, D. H. Davies, T. M. Chong et al., "An extremely diverse CD4 response to vaccinia virus in humans is revealed by proteome-wide T-cell profiling," *Journal of Virology*, vol. 82, no. 14, pp. 7120–7134, 2008.
- [44] H. Meyer, G. Sutter, and A. Mayr, "Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence," *Journal of General Virology*, vol. 72, no. 5, pp. 1031–1038, 1991.
- [45] J. W. Golden and J. W. Hooper, "The strategic use of novel smallpox vaccines in the post-eradication world," *Expert Review of Vaccines*, vol. 10, no. 7, pp. 1021–1035, 2011.
- [46] M. Kim, H. Yang, S.-K. Kim et al., "Biochemical and functional analysis of smallpox growth factor (SPGF) and anti-SPGF monoclonal antibodies," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 24, pp. 25838–25848, 2004.
- [47] H. Yang, S.-K. Kim, M. Kim et al., "Antiviral chemotherapy facilitates control of poxvirus infections through inhibition of cellular signal transduction," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 115, no. 2, pp. 379–387, 2005.
- [48] E. M. Lafuente and P. A. Reche, "Prediction of MHC-peptide binding: a systematic and comprehensive overview," *Current Pharmaceutical Design*, vol. 15, no. 28, pp. 3209–3220, 2009.
- [49] P. A. Reche and E. L. Reinherz, "PEPVAC: a web server for multi-epitope vaccine development based on the prediction of supertypic MHC ligands," *Nucleic Acids Research*, vol. 33, no. 2, pp. W138–W142, 2005.
- [50] A. Sette and J. Sidney, "HLA supertypes and supermotifs: a functional perspective on HLA polymorphism," *Current Opinion in Immunology*, vol. 10, no. 4, pp. 478–482, 1998.
- [51] M. Molero-Abraham, E. M. Lafuente, D. R. Flower, and P. A. Reche, "Selection of conserved epitopes from hepatitis c virus for pan-population stimulation of T-cell responses," *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2013, Article ID 601943, 10 pages, 2013.
- [52] W. Zhong, P. A. Reche, C.-C. Lai, B. Reinhold, and E. L. Reinherz, "Genome-wide characterization of a viral cytotoxic T lymphocyte epitope repertoire," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 46, pp. 45135–45144, 2003.
- [53] W. Kastenmuller, G. Gasteiger, J. H. Gronau et al., "Cross-competition of CD8⁺ T cells shapes the immunodominance hierarchy during boost vaccination," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, no. 9, pp. 2187–2198, 2007.
- [54] C. M. Diez-Rivero and P. A. Reche, "CD8 T cell epitope distribution in viruses reveals patterns of protein biosynthesis," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 8, Article ID e43674, 2012.
- [55] P. A. Reche and E. L. Reinherz, "Definition of MHC supertypes through clustering of MHC peptide-binding repertoires," *Methods in Molecular Biology*, vol. 409, pp. 163–173, 2007.
- [56] B. E. Pickett, E. L. Sadat, Y. Zhang et al., "ViPR: an open bioinformatics database and analysis resource for virology research," *Nucleic Acids Research*, vol. 40, no. 1, pp. D593–D598, 2012.
- [57] C. M. Diez-Rivero, B. Chenlo, P. Zuluaga, and P. A. Reche, "Quantitative modeling of peptide binding to TAP using support vector machine," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 78, no. 1, pp. 63–72, 2010.
- [58] L. Saveanu, O. Carroll, V. Lindo et al., "Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum," *Nature Immunology*, vol. 6, no. 7, pp. 689–697, 2005.

Research Article

Selection of Conserved Epitopes from Hepatitis C Virus for Pan-Population Stimulation of T-Cell Responses

**Magdalena Molero-Abraham,¹ Esther M. Lafuente,¹
 Darren R. Flower,² and Pedro A. Reche¹**

¹ *Facultad de Medicina, Sección de Inmunología, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Complutense S/N, 28040 Madrid, Spain*

² *School of Life and Health Sciences, University of Aston, Aston Triangle, Birmingham B4 7ET, UK*

Correspondence should be addressed to Pedro A. Reche; parecheg@med.ucm.es

Received 2 August 2013; Accepted 19 September 2013

Academic Editor: Masha Fridkis-Hareli

Copyright © 2013 Magdalena Molero-Abraham et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The hepatitis C virus (HCV) is able to persist as a chronic infection, which can lead to cirrhosis and liver cancer. There is evidence that clearance of HCV is linked to strong responses by CD8 cytotoxic T lymphocytes (CTLs), suggesting that eliciting CTL responses against HCV through an epitope-based vaccine could prove an effective means of immunization. However, HCV genomic plasticity as well as the polymorphisms of HLA I molecules restricting CD8 T-cell responses challenges the selection of epitopes for a widely protective vaccine. Here, we devised an approach to overcome these limitations. From available databases, we first collected a set of 245 HCV-specific CD8 T-cell epitopes, all known to be targeted in the course of a natural infection in humans. After a sequence variability analysis, we next identified 17 highly invariant epitopes. Subsequently, we predicted the epitope HLA I binding profiles that determine their potential presentation and recognition. Finally, using the relevant HLA I-genetic frequencies, we identified various epitope subsets encompassing 6 conserved HCV-specific CTL epitopes each predicted to elicit an effective T-cell response in any individual regardless of their HLA I background. We implemented this epitope selection approach for free public use at the EPISOPT web server.

1. Introduction

Hepatitis C virus (HCV) causes a chronic infection that produces liver fibrosis (20% of infected individuals) which can lead to liver failure and the development of liver carcinomas [1]. An estimated 170 million people (3% of the world population) are HCV carriers. Moreover, the prevalence of the infection and associated complications are increasing [1]. Standard therapy against HCV consists of a combination of interferon and ribavirin. This treatment improves symptoms and survival prognosis of patients infected with HCV. However, 50% of patients do not respond adequately, with genotype 1 being especially refractory to treatment [2]. Thus, the development of alternative treatments

against HCV, including an effective vaccine, is of paramount importance.

No vaccine is currently available for HCV infection [3]. With the increasing discovery of new anti-HCV small molecule drugs, some may argue that liver disease associated with HCV will largely disappear and thus that HCV vaccine discovery will become superfluous. However, few of the 170+ million HCV infected population will have access to costly medications. Nor will these medicines treat all patients with equal effectiveness. Therefore, prophylactic treatment of HCV infection by a vaccine represents a cost effective and efficient alternative to medicines. Intravenous drug users—the major group suffering new HCV infections in most locations—have an increased likelihood of reinfection and

would thus also benefit from prophylactic treatments able to prevent chronic HCV infection.

HCV exhibits extraordinary genetic diversity, including at least 6 genotypes (1 (a, b, c), 2 (a, b, c), 3 (a, b), 4a, 5a, and 6a) and 52 different subtypes [2, 4], and this represents a major challenge for vaccine development. Work in humans and chimpanzees (the only animal model susceptible to HCV) shows that antibodies are not decisive in resolution and control of HCV infection [5, 6] possibly because this response is focused on regions of the virus envelope, which experiences extreme sequence variability. In contrast, there is evidence that T cells play a fundamental role in the control of HCV infection, since viral clearance observed during acute transient infection correlates with the activation of CD4 T helper (Th) lymphocytes and, importantly, with a broad and sustained response by cytotoxic CD8 T lymphocytes (CTLs) [7, 8]. In contrast, these responses are weak and limited in patients with chronic infection [5, 9–13]. CTLs contribute to the containment of viral infection by eliminating viral-infected cells and indirectly by secretion of antiviral factors [14], while CD4 Th cells cooperate to produce cytokines that stimulate effector functions of CTLs [15]. Together, this suggests that the development of a vaccine against HCV will likely rely on the induction of T-cell responses and in particular a CTL response. It has been shown that it is possible to induce potent and specific CTL responses when immunizing with adenoviral vectors encoding HCV products [16] and to protect chimpanzees from HCV infection [17]. However, given the extreme mutability of HCV, it is difficult to conceive that acquired immunity to a single HCV strain could protect against other, clearly divergent, strains [18] or prevent the emergence of mutants that escape immune responses [19, 20].

CTL responses are directed against short peptides, epitopes, presented by human leukocyte antigens (HLA I) expressed on the cell surface of antigen presenting and target cells. Therefore, HCV immune evasion could be avoided by appropriate selection of conserved HCV-specific CTL epitopes. Currently, there are hundreds of *bona fide* HCV-specific CTL epitopes deposited in specialized databases. However, HCV diversity and extreme polymorphism of HLA I molecules restricting the CTL responses make optimal epitope selection anything but straightforward, particularly if our aim is developing widely protective epitope-based vaccine. For such a task, we started with a set of 245 HCV-specific CTL epitopes, known to be targeted in the course of a natural infection, and sought minimal subsets of invariant epitopes that could be basis for a widely protective epitope-based vaccine. We found various epitope subsets encompassing 6 conserved HCV-specific CTL epitopes that we predicted could elicit an effective T-cell response in any individual regardless of their HLA I background. Here, we analyzed these results and discussed the reason for epitope conservation. We also introduced EPISOPT (<http://imed.med.ucm.es/Tools/episopt.html>), a server that implements our approach for selecting epitope combinations providing the largest population protection coverage.

TABLE 1: HCV genotype of polyproteins used in this study.

Genotype	Sequences
1	501
2	50
3	7
4	34
5	2
6	61
Unassigned*	29

*Sequences could not be readily classified onto any of the 6 major genotypes. Genotypes were assigned using MuLDAS (<http://www.muldass.org/MuLDAS/>).

2. Materials and Methods

2.1. HCV-Specific CTL Epitopes. We used the EPIMHC [21] and IEDB [22] databases to identify HCV-specific CTL epitopes. Specifically, we collected a set of 245 peptide sequences comprising HCV-specific CTL epitopes. These peptides were reported to stimulate the response of human CTLs elicited in the course of a natural infection by HCV in humans and all have nine residues. When available, we also collected the human MHCI molecule that was determined to restrict the CTL response against the peptide. This peptide set is provided as Supplementary Material in Additional File S1 available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2013/601943> and will be also provided by the corresponding author upon writing request.

2.2. Retrieval, Processing, and Multiple Sequence Alignment of HCV Polyproteins. We generated a multiple sequence alignment (MSA) encompassing 684 entire HCV-polyproteins using MUSCLE [23] with default settings. The HCV-polyproteins included representatives from all HCV genotypes (Table 1). We obtained them from the translation feature (CDS) of HCV nucleotide records retrieved after GenBank genomic accessions identified in the European HCV database (EuHCVdb). To ensure working with full-length polyproteins, we only considered translated CDS with more than 3000 amino acid residues. The multiple sequence alignment (MSA) is provided as supplementary material in Additional File S1.

2.3. Generation of an HCV-Reference Sequence with the Variables Sites Masked. We generated a HCV-reference sequence by calculating the sequence variability in the MSA of HCV-polyproteins using the Shannon entropy [24], H , as a variability metric [25–27]. Briefly, the Shannon entropy is given by

$$H = -\sum_{i=1}^M P_i \log_2 P_i, \quad (1)$$

where P_i is the fraction of residues of amino acid type i and M is equal to 20, the number of amino acid types. H

ranges from 0 (total conservation, only one amino acid type is present at that position) to 4.322 (all 20 amino acids are equally represented in that position).

We assigned the sequence variability, H , to the HCV-polyprotein obtained from *GenBank* accession M62321 (protein id: AAA45676.1) and subsequently masked all positions with a variability, H , greater than 0.5, ensuring that the remaining residue positions are highly conserved [28, 29].

2.4. Prediction of Epitope Presentation by HLA I and Computation of Population Protection Coverage (PPC). CTL epitopes are peptides presented by HLA I molecules and recognized by cytotoxic CD8 T lymphocytes (CTLs). For HLA I molecules can only present to T cells those peptides that bind to them, we anticipated HLA I presentation of epitomes/peptides by predicting HLA I binding. Specifically, we used 55 HLA I-specific motif position-specific scoring matrices (PSSMs) [30–32] to predict epitope binding to the corresponding HLA I molecules. We considered that a given peptide binds to specific HLA I molecule when its binding score ranks within the top 3% percentile of the binding scores computed for 1000 random 9mer peptides (average amino acid composition of proteins in the SwissProt database).

The population protection coverage (PPC) of an arbitrary set of CTL epitopes is given by the proportion of the population that could potentially mount an immune response to any of these epitopes and can be computed by knowing the gene frequencies of the HLA I alleles that can present the epitopes. Given the required HLA I restriction of CTL responses, the PPC for a set of CTL epitopes matches the proportion of the population that exhibits at least one of the HLA I alleles that can bind and present any of those epitopes, which corresponds to the cumulative phenotype frequency (CPF) of the targeted HLA I alleles. In this work, we computed CPF using the equations described elsewhere in [26] and the HLA I allelic and haplotype frequencies published by Cao et al. [33] for 5 major American ethnic groups (Black, Caucasian, Hispanic, Native American, and Asian). HLA I allele frequencies published by Cao et al. [33] cover most common HLA-A, -B, and -C alleles; ~10–20% of all available HLA I sequences in IMGT/HLA database [34].

2.5. Identification of Optimal Epitope Combinations with a Given Population Protection Coverage. In order to identify minimal sets of epitopes (optimal epitope combinations) with a target PPC within a starting set of CD8 T-cell epitopes, we first find the HLA I molecules that could present those epitopes by predicting their binding to 55 HLA I molecules (HLA I binding profile), as indicated elsewhere in Section 2. With the predicted HLA I binding profiles, we can compute CPF and, hence, epitope PPC. Once we have the epitope HLA I binding profiles, we search for epitope combinations from the initial set of epitopes, starting with one epitope and iteratively increasing the number of epitopes being considering, which reach the target PPC. At each iteration, we also computed the largest PPC that can

be reached with the number of epitopes being considered. Because PPC vary for the 5 ethnic groups for which we have HLA I gene allele frequencies, we seek that the target PPC is reached in each ethnic group. We made this method available for identifying minimal set of epitope combinations reaching a target PPC through the EPISOPT web server. EPISOPT is implemented on an Apache Web server running under the Mac OSX operating system. The EPISOPT functional core consists of a PERL CGI (Common Gateway Interface) script that handles the input, executes the above outlined methods, and then assembles and displays the results.

2.6. Other Procedures. We identified three-dimensional (3D) structures of HCV proteins upon BLAST searches [35] with the epitope sequences against the PDB sequence database at NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). We obtained solvent accessibility from the relevant 3D structures using the program NACCESS [36], and we used the server MAST (<http://imed.med.ucm.es/Tools/msat.html>) for mapping the accessibility onto the 3D structures.

3. Result and Discussion

HCV vaccines could prevent chronic HCV infection, a leading cause of both liver fibrosis and liver cancer. Unfortunately, unlike hepatitis A virus (HAV) and hepatitis B virus (HBV) [37, 38], no such HCV vaccine exists. Most vaccines pursue the generation of long lasting immunity mediated by neutralizing antibodies. Thus, current vaccines for HAV and HBV are based on viral-specific recombinant proteins eliciting such type of immunity [38, 39]. In contrast, immunization trials with recombinant HCV proteins have all failed [37], likely because antibodies do not play a key role in the control of the infection by HCV [5, 6]. Targeting the cellular arm of the adaptive immune system residing in the T cells is surely the key for the development of a successful HCV vaccine [7, 8], and multiple T-cell epitope-based vaccines are particularly suitable for that task.

HCV diversity and HLA polymorphisms are a handicap for developing a broadly protective T-cell epitope-based vaccine against HCV. Therefore, epitope selection is a key step for epitope-vaccine design. Given the relevance of CTL responses in the containment of HCV acute infection [7, 8], in this work we sought to find invariant HCV-specific CTL epitopes that could serve to develop approach depicted in Figure 1.

A key feature of the approach is the use of already discovered CTL epitopes. Previous work has yielded large numbers of HCV-specific epitopes, which are available in specialized databases such SYFPEITHI [40], JenPep [41], and MHCBN [42], TEPIDAS [43], Immune Epitope database [44], and EPIMHC [21]. In our study, we collected the HCV-specific epitopes from the EPIMHC and Immune Epitope databases. We sought published, annotated epitopes that are targeted in the course of a natural HCV infection and

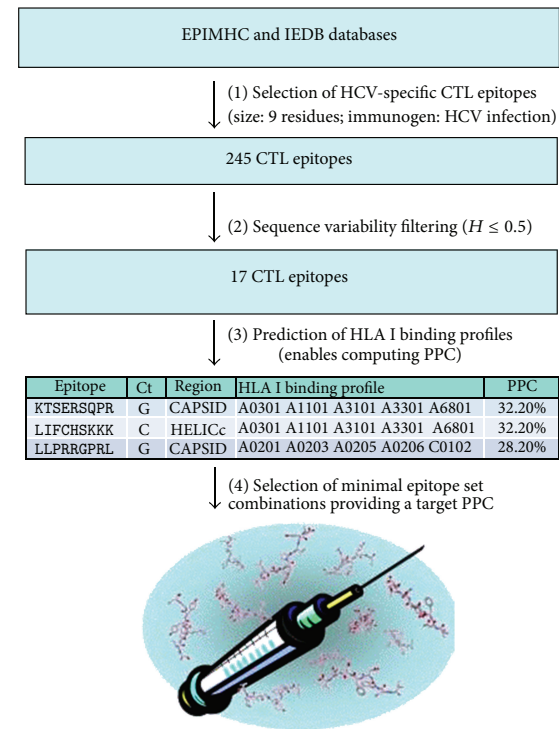


FIGURE 1: HCV epitope selection approach. Overview of the approach devised to select invariant HCV-specific CTL epitopes that could be the basis for a broadly protective epitope-based vaccine against HCV. The approach consists of 4 basic steps: (1) selection of epitopes from databases according to the indicated criteria. Immunogen HCV infection means that all selected HCV epitopes were reported to be targeted in the course of a natural infection in humans. They are immunogenic. (2) Sequence variability filtering. We only considered epitopes that do not contain any residue with a variability given by Shannon entropy, H , greater than 0.5. (3) Prediction of epitope HLA I binding profiles which enables computation of the percentage of the population that will be able to elicit a T-cell response against a particular epitope (PPC). (4) Selection of subsets of epitopes that with a minimum number of epitopes reach a target PPC.

a size of nine residues, assembling a set of 245 HCV-specific CTL epitopes (provided as supplementary material in Additional File S1). The bases for the selection criteria are the following. Appropriate antigen processing is a prerequisite for HLA presentation and limits T-cell recognition [45, 46]. By considering CTL epitopes that are targeted in the course of a natural HCV infection, we assumed that (A) antigen processing is conserved (it will be futile to elicit a T-cell response against an epitope that it is not processed and available for presentation in the course of an infection with HCV) and (B) epitope presentation and T-cell recognition

is only determined by HLA I binding. As for the size of the epitopes, HLA I molecules bind and present peptides from 8 to 11 residues but most of them have 9 residues [30]. There are reports in the literature echoed in the databases of much large peptides, up 30 amino acids, that are capable of eliciting CD8 T-cell responses. These peptides do not represent optimal CD8 T-cell epitopes, as they need further processing prior to HLA I binding.

The next step in our approach (Figure 1) was the identification of highly conserved epitopes. In order to do so, we first carried out a variability analysis of a multiple sequence alignment (MSA) of HCV-polyproteins using Shannon entropy, H (details in Section 2). The MSA included HCV polyproteins from all 6 genotypes; however, genotype 1 was the most represented, with 501 sequences (Table 1). Subsequently, we masked in an HCV-polyprotein reference sequence (AN: AAA45676.1) all variable sites within the MSA with $H > 0.5$. We mapped variability onto this sequence rather than the artificial conserved sequence for two reasons: first, conserved sequences derived upon a MSA tend to be too long and contain stretches of amino acids not present in any real sequence, and secondly, AAA45676.1 has long been used as a reference sequence to design overlapping peptides and check T-cell responses. HCV-polyprotein AAA45676.1 with the variable sites masked is depicted in Figure 2 showing the location of the mature proteins. We used this sequence to discard those epitopes that have any residue, including those flanking the C-terminus, with $H > 0.5$. The residue flanking the C-terminus of the CTL epitope is a determinant for proteasome cleavage, and mutations in that residue can abrogate T-cell recognition [47]. Thus, we also required that residue to be invariant. Only 17 epitopes meet these criteria and are shown in Table 2. That such a few peptides have all their residues with entropy $H \leq 0.5$ reflects the large genomic plasticity of HCV.

In general, most of the invariant epitopes reside in the CAPSID and CORE proteins of HCV. One reason for this preferred location is that these two proteins seem to be the most conserved. However, regardless of such conservation, we recently showed that proteins located at the N-terminus of polyproteins bear more epitopes than expected for the size because they are preferentially translated [25]. To find structure-function determinants for the conservation of these particular 17 epitopes, we identified three-dimensional structures of HCV proteins bearing the identified epitopes (Table 2) and mapped them onto the 3D structure (Figure 3) (see details in Section 2). We could only map 5 of the 17 conserved epitopes: four of them, LIFCHSKKK, HSKKKCDEL, ITYSTYGKF, and TYSTYGKFL mapped onto two different domains of the NS3 helicase (Figures 3(a) and 3(b)), while one, TIMAKNEVF, mapped onto the RNA polymerase of HCV (Figure 3(c)). Note that the epitopes LIFCHSKKK and HSKKKCDEL overlap and so the epitopes ITYSTYGKF and TYSTYGKFL. Interestingly, all these epitopes bear a large proportion of residues that are hydrophobic and buried in the 3D structure (shown in blue in Figures 3(a), 3(b), and 3(c)). The relative accessibility of each of the epitope residues is shown in Figure 4. For example, the fragment ITYSTYGKFL (it contains two overlapping epitopes) and



FIGURE 2: HCV polyprotein with variable positions masked. The figure shows the amino acid sequence HCV-polyprotein (protein id; AAA45676.1) with residues positions with a sequence variability >0.5 masked (shown as dots). We computed sequence variability from a multiple sequence alignment of HCV polyproteins using Shannon entropy, *H*, and masked the variable sites on the reference sequence as detailed in Section 2. The mature proteins that arise upon HCV-polyprotein processing are indicated.

the epitope TIMAKNEVF only contain residues that are completely buried or semiburied and many are hydrophobic (Figures 3 and 4). These residues form part of the protein hydrophobic core and are key for protein stability. Therefore, the selected epitopes are conserved as they comprise residues involved in protein stability.

Because we aimed to set the basis for a broadly protective epitope-based vaccine against HCV, our next move was to be able to compute the expected population protection coverage (PPC) of any given set of epitopes, defined as the percentage of the population that would be able to elicit a T-cell response against any of them. To this end, we first predicted the binding of each conserved epitope to 55 HLA I molecules for which we have suitable predictors (details in Section 2) thus obtaining predicted epitope HLA I binding profiles. We assumed that any epitope that binds to a given HLA I molecule would be presented and able to elicit a T-cell response. Under this

scenario, the HLA I binding profile of a given epitope determines its potential PPC, and we computed it using genetic HLA I frequencies for 5 ethnic groups in the American population [33] (see Section 2 for a detailed explanation). In Table 2, we show the predicted HLA I binding profiles of the 17 conserved HCV-specific epitopes. With this data, we then aimed to identify epitope combinations reaching a 95% PPC in all five ethnic groups being considered, using the method, described in Section 2. This method does not guarantee any multispecificity, as it only seeks for epitope combinations reaching a target PPC. Multispecificity is a common scenario in the course of natural infection as any given individual will elicit T-cell responses against at least two or three immunodominant pathogen-specific epitopes [49].

We found that a PPC > 80% can be reached with just 3 epitopes, LLPRRGPR, KTSERSQPR/LIFCHSKK (both

TABLE 2: Selected conserved HCV-specific T-cell epitopes with predicted HLA I binding profiles.

Epitope	Ct	Region	N	3D	3D-N	PPC	HLA I binding profile
KTSEERSQPR	G	CAPSID	71	NA	—	32.2%	A0301 A1101 A3101 A3301 A6801
LIFCHSKKK	C	HELICc	1391	2F55 A	365–373	32.2%	A0301 A1101 A3101 A3301 A6801
LLPRRGPR	L	CAPSID	36	1XCQ P	—	28.2%	A0201 A0203 A0205 A0206 C0102
LPGCSFSIF	L	CORE	169	NA	—	27.8%	B0702 B1502 B1508 B3501 B5301 B5401
DPRRRSRNL	G	CAPSID/CORE	101	NA	—	26.9%	B0702 B0801 B5101 B5102 B5103 B5301 B5401
GFADLMGYI	P	CORE	129	NA	—	6.3%	A0202 A0203 A0205 A6802 B3801
NLPGCSFSI	F	CORE	168	NA	—	5.9%	A0205 C0102
SFSIFLLAL	L	CORE	173	NA	—	5.5%	A2402
TYSTYGKFL	A	DEXDC	1292	2F55 A	266–274	5.5%	A2402
ITYSTYGKF	L	DEXDC	1291	2F55 A	265–273	2.7%	B1516 B1517 B5702 B5801
HSKKKCDEL	A	HELICc	1395	2F55 A	369–377	2.5%	B0801
YLLPRRGPR	L	CAPSID	35	1XCQ P	—	1.4%	A3301 A6601 A6801
GQIVGGVYL	L	CAPSID	28	1XCQ P	—	0.4%	A0206 A0214 B1510 B4002
TIMAKNEVF	C	RNADP	2587	2BRK A	137–145	0	B1513 B5702
GPRLGVRAT	R	CAPSID	61	NA	—	0	
RLGVRATRK	T	CAPSID	63	NA	—	0	
STGLIHLHQ	N	NS1	686	NA	—	0	

Epitope: amino acid sequence of the epitope; Ct: residue that flanks the C-terminal end of the epitope; Region: protein/domain in HCV polyprotein bearing the epitope; N: position in HCV polyprotein of the epitope N-terminal residue; 3D: PDB code with 3D structure of protein encompassing the epitope; 3D-N: location of the epitope in the 3D structure; PPC: population protection coverage; HLA I binding profile: HLA I molecules predicted to present the epitope. All epitope residues and c-terminal flanking residues have $H \leq 0.5$. PPC values equal to the lower value computed with the gene frequencies corresponding to 5 ethnic populations [33]. PDB 1XCQ|P corresponds to a peptide from HCV capsid bound to an antibody Fab; hence we do not show the location of the epitope in the 3D structure. NA: PDB not available.

epitopes have the same HLA I binding profile), and LPGCSFSIF (Figure 5(a)). This is not surprising as these epitopes seem to target 3 mayor supertypes: A2, A3, and B7 [50–52]. Note, however, that we predicted peptide binding to MHC I molecules beyond predefined HLA I supertypes. To reach a $PPC \geq 95\%$ however, we found that 6 epitopes were required. Moreover, we found that there were 15 different 6-epitope combinations, differing in at least one epitope, providing a $PPC \geq 95\%$. The largest PPC reached by one of these epitope combinations was of 97% and included the following peptide sequences: LLPRRGPR, GFADLMGY, KTSEERSQPR/LIFCHSKKK, SFSIFLLAL, LPGCSFSIF, and ITYSTYGKE. All 6-epitope combinations reaching $PPC \geq 95\%$ are provided as supplementary data in Additional File S3. All these epitopes combinations differ one from each other in at least one epitope. We also analyzed what epitopes were actually included in the resulting solutions. Of all the epitopes in Table 2, only the first 12 were included in at least one of the epitope combinations reaching $PPC \geq 95\%$, while the last 5 were never included. The frequency at which the peptides were included in these combinations is shown in Figure 5(b) and varied from 15 times for peptide LLPRRGPR (it was included in each of the epitope combinations reaching $PPC \geq 95\%$) to only once for GQIVGGVYL.

Overall, the results shown here indicate that only a handful of conserved HCV-specific epitopes would be needed to elicit CD8 T-cell responses in any individual regardless of their genetic background. We have preliminary data corroborating these predictions. Thus, we have consistently detected responses on T cells from naïve people primed and expanded using dendritic cells loaded with HCV-peptide pools representing single 6-epitope combinations of $PPC \geq 95\%$ (data not shown). However, we only analyzed the responses in a few individuals and more experiments are underway. It is also important to highlight that our results only provide conserved CTL epitope solutions for a potential epitope-based vaccine against HCV to be broadly protective. We know that the eventual development of an epitope-based vaccine against HCV is a complex task that will require optimizing peptide-epitope assembling and vaccine delivery [53]. Moreover, such vaccine will also need to incorporate Th epitopes as well as signals/adjuvants for alerting the innate immune system and initiate an adaptive response.

While in this study we focused on HCV, the same approach could easily be extended to other pathogens; there are thousands of CTL epitopes readily available for many other pathogens. To facilitate that end, we introduced

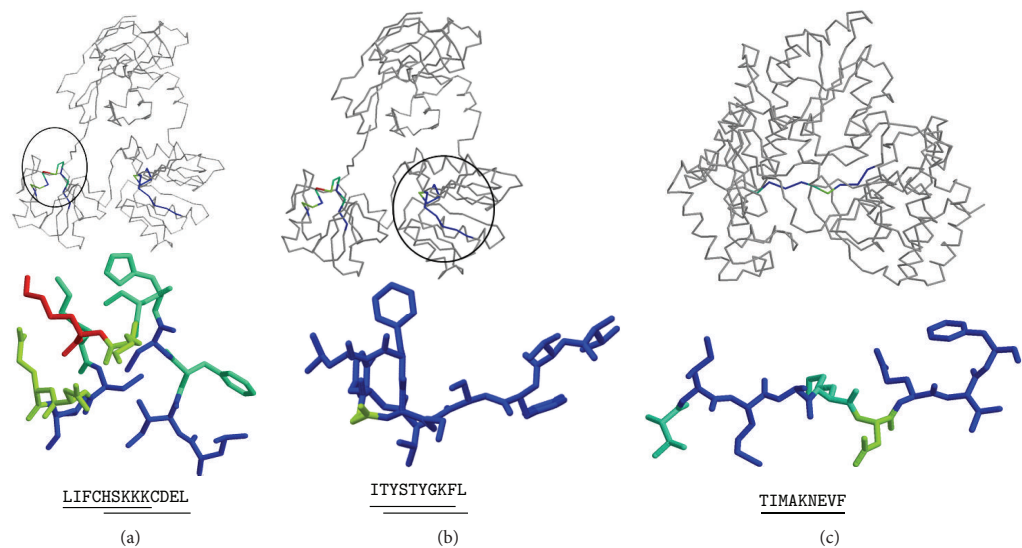


FIGURE 3: Three-dimensional structure mapping of HCV-specific invariant CTL epitopes. HCV fragments LIFCHSKKKCDEL and ITYSTYGKFL map onto two different regions of the 3D structure of HCV NS3 helicase (PDB: 2F55), (a) and (b), respectively. Each of these two fragments encompasses two overlapping HCV-specific epitopes. The HCV epitope TIMAKNEVF maps onto HCV polymerase (PDB: 2BRK) (c). Residue color used in the illustrations is related to their solvent accessibility and goes from blue for buried residues to red for accessible residues. Overlapping HCV-specific CTL epitopes are shown underlined. Solvent accessibility was calculated and mapped onto the 3D structures as indicated in Section 2. The figures were rendered using Rasmol [48].

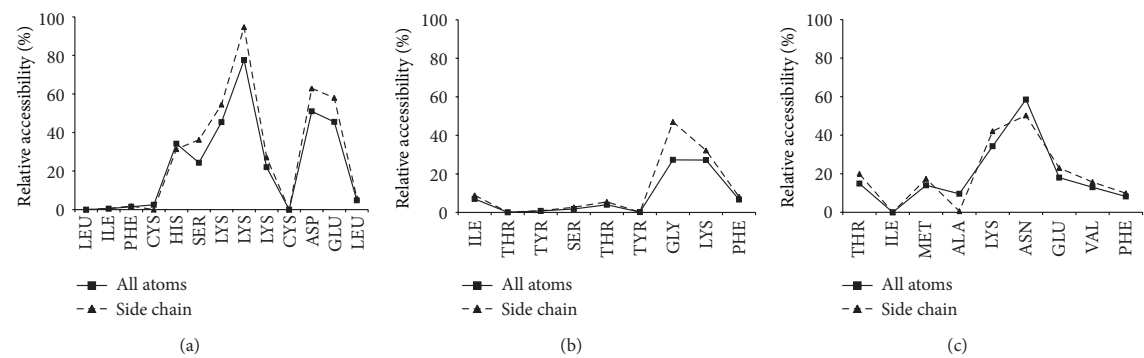


FIGURE 4: Solvent accessibility of HCV-specific epitopes with counterpart protein 3D structures. The figure depicts a plot of the relative solvent accessibility (%) (y-axis) of each of the residues (x-axis) in the HCV fragments LIFCHSKKKCDEL (a), ITYSTYGKFL (b) and TIMAKNEVF (c). We plotted both solvent accessibility considering all atoms (squares) and just residue side chains (triangles). Solvent accessibility was calculated from the relevant protein 3D structures using NACCESS [36].

the EPISOPT server (<http://imed.med.ucm.es/Tools/episopt.html>). The EPISOPT server (Figure 6) implements the steps in our approach consisting of predicting epitope HLA I binding profiles and identifying minimal sets of epitopes reaching a determined PPC. In the future, we will enhance

EPISOPT with sequence variability analyses to select invariant epitopes. EPISOPT is somewhat similar to another online tool developed by Bui et al. [54] available at http://tools.immuneepitope.org/tools/population/iedb_input. Both tools implement a similar method to compute PPC. However,

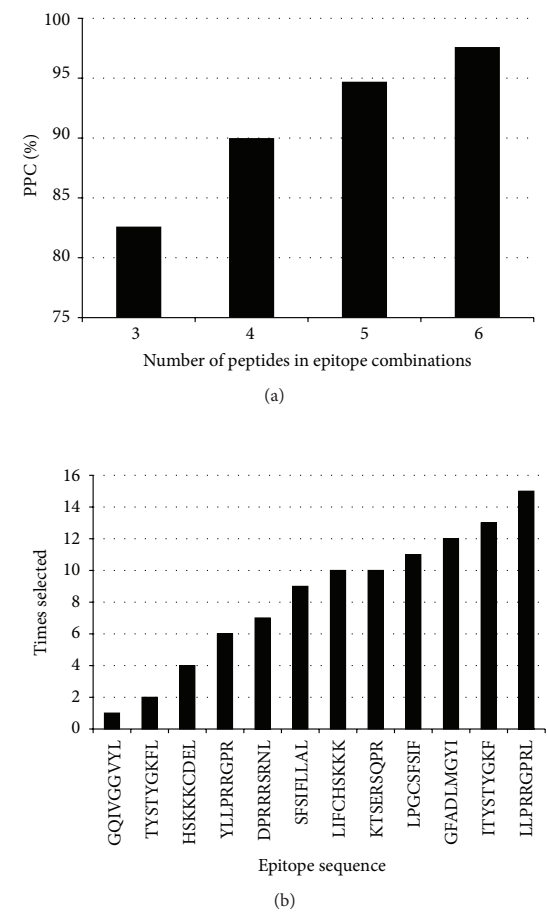


FIGURE 5: Analysis of HCV-specific CTL epitope set selection. (a) The figure depicts the largest PCC that was reached by HCV-specific CTL epitope combinations containing 3, 4, 5, and 6 epitopes (optimal combinations). As shown, with just 3 epitopes it is possible to reach a PPC $\geq 80\%$ and 6 epitopes were required to reach a PPC $\geq 95\%$. (b) We found 15 distinct combinations of 6 epitopes each reaching a PPC $\geq 95\%$ within the 17 invariant HCV-specific CTL epitopes. In the figure, we depicted the sequence of peptides (x-axis) that were included in the mentioned epitope combinations and the times that were included (y-axis).

unlike EPISOPT, Bui et al. [54] tool requires entering the HLA I binding profiles of epitopes as input—it does not predict them—and it does not find epitope combinations reaching a given PPC. We are hopeful that in time, the results and methods derived from this work will make a significant contribution to the design of epitope-based vaccines.

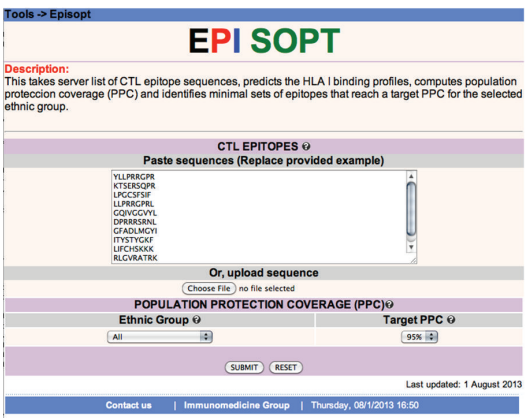


FIGURE 6: EPISOPT web page. The figure shows the input page of EPISOPT. Currently, users enter a list of CTL epitope sequences and select a target PPC and population group. On submission, EPISOPT will find minimal epitope combinations reaching the desired PPC in the selected population group.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgment

This work was supported by Grant SAF2009:08103 from MICCIN to Pedro A. Reche.

References

- [1] T. Poynard, M. Yuen, V. Ratziu, and C. Lung Lai, "Viral hepatitis C," *The Lancet*, vol. 362, no. 9401, pp. 2095–2100, 2003.
- [2] P. Simmonds, J. Bukh, C. Combet et al., "Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes," *Hepatology*, vol. 42, no. 4, pp. 962–973, 2005.
- [3] M. Houghton and S. Abrignani, "Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus," *Nature*, vol. 436, no. 7053, pp. 961–966, 2005.
- [4] J. J. Wilson, S. J. Polyak, T. D. Day, and D. R. Gretch, "Characterization of simple and complex hepatitis C virus quasiespecies by heteroduplex gel shift analysis: correlation with nucleotide sequencing," *Journal of General Virology*, vol. 76, no. 7, pp. 1763–1771, 1995.
- [5] F. Lechner, D. K. H. Wong, P. R. Dunbar et al., "Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 191, no. 9, pp. 1499–1512, 2000.
- [6] G. Missale, R. Bertoni, V. Lamonaca et al., "Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 98, no. 3, pp. 706–714, 1996.
- [7] R. Thimme, J. Bukh, H. C. Spangenberg et al., "Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease," *Proceedings of the National Academy*

- of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 24, pp. 15661–15668, 2002.
- [8] R. Thimme, D. Oldach, K. Chang, C. Steiger, S. C. Ray, and F. V. Chisari, “Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 194, no. 10, pp. 1395–1406, 2001.
 - [9] P. Sarobe, J. J. Lasarte, N. García, M. P. Civeira, F. Borrás-Cuesta, and J. Prieto, “Characterization of T-cell responses against immunodominant epitopes from hepatitis C virus E2 and NS4a proteins,” *Journal of Viral Hepatitis*, vol. 13, no. 1, pp. 47–55, 2006.
 - [10] D. G. Bowen and C. M. Walker, “Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection,” *Nature*, vol. 436, no. 7053, pp. 946–952, 2005.
 - [11] K. Deterding, S. V. Pothakamuri, V. Schlaphoff et al., “Clearance of chronic HCV infection during acute delta hepatitis,” *Infection*, vol. 37, no. 2, pp. 159–162, 2009.
 - [12] S. Gaudieri, A. Rauch, L. P. Park et al., “Evidence of viral adaptation to HLA class I-restricted immune pressure in chronic hepatitis C virus infection,” *Journal of Virology*, vol. 80, no. 22, pp. 11094–11104, 2006.
 - [13] J. J. Lasarte, M. García-Granero, A. López et al., “Cellular immunity to hepatitis C virus core protein and the response to interferon in patients with chronic hepatitis C,” *Hepatology*, vol. 28, no. 3, pp. 815–822, 1998.
 - [14] D. K. Wong, D. D. Dudley, P. B. Dohrenwend et al., “Detection of diverse hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes in peripheral blood of infected persons by screening for responses to all translated proteins of HCV,” *Journal of Virology*, vol. 75, no. 3, pp. 1229–1235, 2001.
 - [15] A. Zabaleta, L. Arribillaga, D. Llopiz et al., “Induction of potent and long-lasting CD4 and CD8 T-cell responses against hepatitis C virus by immunization with viral antigens plus poly(I:C) and anti-CD40,” *Antiviral Research*, vol. 74, no. 1, pp. 25–35, 2007.
 - [16] L. Arribillaga, A. L. D. De Cerio, P. Sarobe et al., “Vaccination with an adenoviral vector encoding hepatitis C virus (HCV) NS3 protein protects against infection with HCV-recombinant vaccinia virus,” *Vaccine*, vol. 21, no. 3–4, pp. 202–210, 2002.
 - [17] A. Folgieri, S. Capone, L. Ruggeri et al., “A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees,” *Nature Medicine*, vol. 12, no. 2, pp. 190–197, 2006.
 - [18] J. S. Zur Wiesch, G. M. Lauer, J. Timm et al., “Immunologic evidence for lack of heterologous protection following resolution of HCV in patients with non-genotype 1 infection,” *Blood*, vol. 110, no. 5, pp. 1559–1569, 2007.
 - [19] H. Komatsu, G. Lauer, O. G. Pybus et al., “Do antiviral CD8+ T cells select hepatitis C virus escape mutants? Analysis in diverse epitopes targeted by human intrahepatic CD8+ T lymphocytes,” *Journal of Viral Hepatitis*, vol. 13, no. 2, pp. 121–130, 2006.
 - [20] L. Uebelhoefer, J. Han, B. Callendret et al., “Stable cytotoxic T cell escape mutation in hepatitis C virus is linked to maintenance of viral fitness,” *PLoS Pathogens*, vol. 4, no. 9, Article ID e1000143, 2008.
 - [21] P. A. Reche, H. Zhang, J. Glutting, and E. L. Reinherz, “EPMHC: a curated database of MHC-binding peptides for customized computational vaccinology,” *Bioinformatics*, vol. 21, no. 9, pp. 2140–2141, 2005.
 - [22] B. Peters, J. Sidney, P. Bourne et al., “The immune epitope database and analysis resource: from vision to blueprint,” *PLoS Biology*, vol. 3, no. 3, p. e91, 2005.
 - [23] R. C. Edgar, “MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput,” *Nucleic Acids Research*, vol. 32, no. 5, pp. 1792–1797, 2004.
 - [24] C. E. Shannon, “The mathematical theory of communication,” *The Bell System Technical Journal*, vol. 27, pp. 379–423; 623–656, 1948.
 - [25] C. M. Diez-Rivero and P. A. Reche, “CD8 T cell epitope distribution in viruses reveals patterns of protein biosynthesis,” *PLoS ONE*, vol. 7, Article ID e43674, 2012.
 - [26] P. A. Reche, D. B. Keskin, R. E. Hussey, P. Ancuta, D. Gabuzda, and E. L. Reinherz, “Elicitation from virus-naïve individuals of cytotoxic T lymphocytes directed against conserved HIV-1 epitopes,” *Medical Immunology*, vol. 5, p. 1, 2006.
 - [27] M. Garcia-Boronat, C. M. Diez-Rivero, E. L. Reinherz, and P. A. Reche, “PVS: a web server for protein sequence variability analysis tuned to facilitate conserved epitope discovery,” *Nucleic Acids Research*, vol. 36, pp. W35–W41, 2008.
 - [28] P. A. Reche and E. L. Reinherz, “Sequence variability analysis of human class I and class II MHC molecules: functional and structural correlates of amino acid polymorphisms,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 331, no. 3, pp. 623–641, 2003.
 - [29] J. J. Stewart, C. Y. Lee, S. Ibrahim et al., “A Shannon entropy analysis of immunoglobulin and T cell receptor,” *Molecular Immunology*, vol. 34, no. 15, pp. 1067–1082, 1997.
 - [30] P. A. Reche, J.-P. Glutting, H. Zhang, and E. L. Reinherz, “Enhancement to the RANKPEP resource for the prediction of peptide binding to MHC molecules using profiles,” *Immunogenetics*, vol. 56, no. 6, pp. 405–419, 2004.
 - [31] P. A. Reche, J. P. Glutting, and E. L. Reinherz, “Prediction of MHC class I binding peptides using profile motifs,” *Human Immunology*, vol. 63, no. 9, pp. 701–709, 2002.
 - [32] P. A. Reche and E. L. Reinherz, “Prediction of peptide-MHC binding using profiles,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 409, pp. 185–200, 2007.
 - [33] K. Cao, J. Hollenbach, X. Shi, W. Shi, M. Chopek, and M. A. Fernández-Viña, “Analysis of the frequencies of HLA-A, B, and C alleles and haplotypes in the five major ethnic groups of the United States reveals high levels of diversity in these loci and contrasting distribution patterns in these populations,” *Human Immunology*, vol. 62, no. 9, pp. 1009–1030, 2001.
 - [34] J. Robinson, J. A. Halliwell, H. McWilliam, R. Lopez, P. Parham, and S. G. Marsh, “The IMGT/HLA database,” *Nucleic Acids Research*, vol. 41, pp. D1222–D1227, 2013.
 - [35] S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schäffer et al., “Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs,” *Nucleic Acids Research*, vol. 25, no. 17, pp. 3389–3402, 1997.
 - [36] S. J. Hubbard and J. M. Thornton, *NACCESS, Computer Program, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London, London, UK*, 1993.
 - [37] L. Swadling, P. Klenerman, and E. Barnes, “Ever closer to a prophylactic vaccine for HCV,” *Expert Opinion on Biological Therapy*, vol. 13, no. 8, pp. 1109–1124, 2013.
 - [38] C. T. Nguyen and T. T. Tran, “Hepatitis vaccination and prophylaxis,” *Clinics in Liver Disease*, vol. 13, no. 2, pp. 317–329, 2009.
 - [39] J. P. Davis, “Experience with hepatitis A and B vaccines,” *American Journal of Medicine*, vol. 118, supplement 10, pp. 7S–15S, 2005.
 - [40] H. G. Rammensee, J. Bachmann, N. P. N. Emmerich, O. A. Bacher, and S. Stevanović, “SYFPEITHI: database for MHC

- ligands and peptide motifs," *Immunogenetics*, vol. 50, no. 3-4, pp. 213-219, 1999.
- [41] M. J. Blythe, I. A. Doytchinova, and D. R. Flower, "JenPep: a database of quantitative functional peptide data for immunology," *Bioinformatics*, vol. 18, no. 3, pp. 434-439, 2002.
- [42] M. Bhasin, H. Singh, and G. P. S. Raghava, "MHCBN: a comprehensive database of MHC binding and non-binding peptides," *Bioinformatics*, vol. 19, no. 5, pp. 665-666, 2003.
- [43] C. M. Diez-Rivero, M. Garcia-Boronat, and P. A. Reche, "Integrating T-cell epitope annotations with sequence and structural information using DAS," *Bioinformatics*, vol. 3, no. 4, pp. 156-158, 2008.
- [44] Q. Zhang, P. Wang, Y. Kim et al., "Immune epitope database analysis resource (IEDB-AR)," *Nucleic Acids Research*, vol. 36, pp. W513-W518, 2008.
- [45] W. Zhong, P. A. Reche, C. Lai, B. Reinhold, and E. L. Reinherz, "Genome-wide characterization of a viral cytotoxic T lymphocyte epitope repertoire," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 46, pp. 45135-45144, 2003.
- [46] M. Wang, K. Lamberth, M. Harndahl et al., "CTL epitopes for influenza A including the H5N1 bird flu; genome-, pathogen-, and HLA-wide screening," *Vaccine*, vol. 25, no. 15, pp. 2823-2831, 2007.
- [47] R. Draenert, S. Le Gall, K. J. Pfafferoth et al., "Immune selection for altered antigen processing leads to cytotoxic T lymphocyte escape in chronic HIV-1 infection," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 199, no. 7, pp. 905-915, 2004.
- [48] A. Sayle and E. J. Milner-White, "RASMOL: biomolecular graphics for all," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 20, no. 9, pp. 374-376, 1995.
- [49] J. W. Yewdell and J. R. Bennink, "Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses," *Annual Review of Immunology*, vol. 17, pp. 51-88, 1999.
- [50] P. A. Reche and E. L. Reinherz, "Definition of MHC supertypes through clustering of MHC peptide binding repertoires," in *Artificial Immune Systems*, pp. 189-196, Springer, Berlin, UK, 2004.
- [51] P. A. Reche and E. L. Reinherz, "PEPVAC: a web server for multi-epitope vaccine development based on the prediction of supertypic MHC ligands," *Nucleic Acids Research*, vol. 33, no. 2, pp. W138-W142, 2005.
- [52] A. Sette and J. Sidney, "Nine major HLA class I supertypes account for the vast preponderance of HLA-A and -B polymorphism," *Immunogenetics*, vol. 50, no. 3-4, pp. 201-212, 1999.
- [53] A. Sette and J. Fikes, "Epitope-based vaccines: an update on epitope identification, vaccine design and delivery," *Current Opinion in Immunology*, vol. 15, no. 4, pp. 461-470, 2003.
- [54] H. H. Bui, J. Sidney, K. Dinh, S. Southwood, M. J. Newman, and A. Sette, "Predicting population coverage of T-cell epitope-based diagnostics and vaccines," *BMC Bioinformatics*, vol. 7, p. 153, 2006.